

Aus der Klinik für Innere Medizin - Schwerpunkt Nephrologie  
(Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Hoyer)  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum  
Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg

## **Die Rolle der $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten $\text{K}^{+}$ -Kanäle**

### **$\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ und $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ bei retinalen Angiogeneseprozessen**



Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Denis Rappert aus Würzburg

Marburg, 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin der  
Philipps-Universität Marburg am 01 April 2011

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Rothmund

Referent: PD Dr. rer. nat. Ralf Köhler

1.Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Niels Decher

# Inhaltsverzeichnis

## I ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... 6

## II ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... 8

## 1 EINLEITUNG..... 9

### 1.1 Angiogeneseprozesse ..... 9

#### 1.1.1 Vaskulogenese ..... 9

#### 1.1.2 Angiogenese ..... 10

#### 1.1.3 Arteriogenese..... 11

### 1.2 Augenentwicklung ..... 12

#### 1.2.1 Gefäßentwicklung im Auge..... 12

### 1.3 Ionenkanäle und Angiogenese ..... 15

### 1.4 $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Kaliumkanäle ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ): ..... 16

#### 1.4.1 $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ ( $\text{IK}_{\text{Ca}}$ , intermediate conductance) ..... 17

#### 1.4.2 $\text{K}_{\text{Ca}2.X}$ ( $\text{SK}_{\text{Ca}}$ , small conductance) ..... 19

### 1.5 Mausmodelle zur Charakterisierung von $\text{K}_{\text{Ca}}$ ..... 21

#### 1.5.1 $\text{K}_{\text{Ca}3.1}^{-/-}$ transgenes Mausmodell ..... 21

#### 1.5.2 $\text{K}_{\text{Ca}2.3}^{\text{T/T}}$ transgenes Mausmodell ..... 22

#### 1.5.3 $\text{K}_{\text{Ca}3.1}^{-/-}/\text{K}_{\text{Ca}2.3}^{\text{T/T}}$ doppeltransgenes Mausmodell ..... 24

### 1.6 Zielsetzung..... 26

## 2 MATERIAL UND METHODEN ..... 29

### 2.1 Chemikalien und Geräte ..... 29

#### 2.1.1 Chemikalien (Bezugsquelle)..... 29

#### 2.1.2 Geräte und Materialien (Hersteller)..... 29

<b>2.2</b>	<b>Tierzucht, Medikamentengabe, Genotypisierung .....</b>	<b>30</b>
2.2.1	Tierzucht.....	30
2.2.2	Doxyzyklin-Behandlung.....	31
2.2.3	Genotypisierung .....	31
<b>2.3</b>	<b>Präparatherstellung .....</b>	<b>32</b>
2.3.1	Retinapräparation.....	32
2.3.2	Gefäßanfärbung .....	35
<b>2.4</b>	<b>Mikroskopie .....</b>	<b>36</b>
2.4.1	Software.....	38
<b>2.5</b>	<b>Auswertung .....</b>	<b>39</b>
2.5.1	Flächenanalyse.....	40
2.5.2	Analyse der Verzweigungen.....	41
2.5.3	Analyse der Durchmesser.....	43
<b>2.6</b>	<b>Statistische Analysen .....</b>	<b>43</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>45</b>
<b>3.1</b>	<b>Tierzucht, Medikamentengabe und Genotypisierung.....</b>	<b>45</b>
3.1.1	Tierzucht.....	45
3.1.2	Doxyzyklin-Behandlung.....	45
3.1.3	Genotypisierung .....	46
<b>3.2</b>	<b>Präparatherstellung .....</b>	<b>48</b>
3.2.1	Retinapräparation.....	48
3.2.2	Gefäßanfärbung .....	50
<b>3.3</b>	<b>Auswirkung des Verlustes von <math>K_{Ca3.1}</math>, <math>K_{Ca2.3}</math> oder beider Kanäle.....</b>	<b>50</b>
3.3.1	Flächenanalyse.....	51
3.3.2	Analyse der Verzweigungen.....	52
3.3.3	Analyse der Durchmesser.....	52

<b>3.4</b>	<b>Unterschiede wachsender Gefäßsysteme von 5- und 7-Tage alten Mäusen</b>	<b>54</b>
3.4.1	Flächenanalyse.....	54
3.4.2	Analyse der Verzweigungen.....	56
<b>3.5</b>	<b>Überexpression von K<sub>Ca</sub>2.3 und Kompensation von K<sub>Ca</sub>3.1-Knockout .....</b>	<b>57</b>
3.5.1	Flächenanalyse.....	58
3.5.2	Analyse der Verzweigungen.....	59
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>61</b>
<b>4.1</b>	<b>Phänotyp und Doxyzyklin-Gabe .....</b>	<b>61</b>
<b>4.2</b>	<b>Analyseverfahren adulter und juveniler Retinae .....</b>	<b>62</b>
4.2.1	Analyse der Fläche .....	62
4.2.2	Analyse der Verzweigungen.....	63
4.2.3	Analyse der Durchmesser.....	64
<b>4.3</b>	<b>Vergleiche der Ergebnisse mit bestehenden Befunden .....</b>	<b>65</b>
4.3.1	Ionenkanäle bei retinalen Angiogenese Prozessen .....	65
4.3.2	Einfluss von K <sub>Ca</sub> 3.1 und K <sub>Ca</sub> 2.3 auf retinale Angiogenese Prozesse.....	65
<b>4.4</b>	<b>Mögliche therapeutische Perspektiven .....</b>	<b>66</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>VERZEICHNIS AKADEMISCHER LEHRER.....</b>	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>81</b>

**I ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AF	Alexa Fluor
AK	Antikörper
AP 1	Aktivatorprotein 1
Aqp	Aquaporin
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BK	Big Conductance
Bp	Basenpaar
CaM	Calmodulin
cAMP	Cyclic Adenosin-5'-Monophosphate
CLIC	Chloride Intracellular Channel
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CMV	Cytomegalie Virus
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNTP	Deoxynucleotide Triphosphate
DOX	Doxyzyklin
EC	Endothelial Cell
EC50	mittlere effektive Konzentration
EGF	Endothelial Growth Factor
EPC	Endothelial Progenitor Cells
ERK	Extracellular Signal-regulated Kinase
ES	Embryonale Stammzellen
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
HIF	Hypoxia Inducible Factor
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IK	Intermediate Conductance
IP3	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IVC	Individual Ventilated Cage
K <sub>Ca</sub> 3.1	Calciumabhängiger Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit

---

K <sub>Ca</sub> 2.X	Calciumabhängiger Kaliumkanal niedriger Leitfähigkeit
Kir	Kalium Inverted Rectifier
KO	Knockout
LSM	Laser-scanning-Mikroskop
MAPK	Mitogen Aktivated Proteine Kinase
MCP	Monocyte Chemotactive Protein
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
NGS	Normal Goat Serum
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PFA	Paraformaldehyd
PGI <sub>2</sub>	Prostacyclin
RAF	Rat Fibrosarcoma
RAS	Rat Sarcoma
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SK	Small Conductance
SMC	Smooth Muscle Cell
SPF	Specific Pathogen Free
SV	Simian Virus
Taq	Thermus aquaticus
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
tTA	Tetrazyklin Transaktivator
VEGF	Vascular Endothelial Growth Faktor

## II ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1-1: A: Gefäßentwicklung am Auge abhängig von der Zeit .....	14
Abb. 1-1: B: Darstellung der einzelnen Gefäßnetze.....	14
Abb. 1-2: Phylogenetischer Stammbaum von $K_{Ca}$ -Kanälen.....	17
Abb. 1-3: Genstruktur des $K_{Ca3.1}$ -Wildtypgens und des $K_{Ca3.1}$ -Knockoutgens .....	22
Abb. 1-4: Schema des Doxyzyklin-sensitiven $K_{Ca2.3}^T$ -Gens.....	24
Abb. 1-5: Vererbungsschema für das $K_{Ca3.1}$ und das $K_{Ca2.3}^T$ -Gen.....	25
Abb. 2-1: Schritte der Präparatherstellung .....	34
Abb. 2-2: Einschiebbares ApoTome .....	38
Abb. 2-3: Präparate mit und ohne Benutzung des ApoTome.....	40
Abb. 2-4: Analyse der Verzweigungen bei unterschiedlichen Altersstufen.....	42
Abb. 2-5: Analyse der Durchmesser.....	43
Abb. 3-1: Schematische Darstellung der Bindung spez. Primer für das $K_{Ca3.1}$ -Gen ....	46
Abb. 3-2: Schematische Darstellung der Bindung spez. Primer für das $K_{Ca2.3}^T$ -Gen...	47
Abb. 3-3: Exemplarische Darstellung einer Multiplex PCR;.....	48
Abb. 3-4: 5-Tage alte Retina mit ausgeprägtem hyaloidem Gefäßsystem .....	49
Abb. 3-5: Gleiche Retina ohne (A) und mit (B) Nachbearbeitung.....	50
Abb. 3-6: Flächenanalyse adulter Tiere;.....	51
Abb. 3-7: Analyse der Verzweigungen adulter Tiere;.....	52
Abb. 3-8: Durchmesser kleiner Kapillaren bei adulten Tieren;.....	53
Abb. 3-9: Durchmesser großer Arterien bei adulten Tieren; .....	53
Abb. 3-10: Fertige Präparate verschiedener Altersstufen.....	54
Abb. 3-11: Flächenanalyse 5-Tage alter Tiere; .....	55
Abb. 3-12: Flächenanalyse 7-Tage alter Tiere; .....	55
Abb. 3-13: Analyse der Verzweigungen 5-Tage alter Tiere; .....	56
Abb. 3-14: Analyse der Verzweigungen 7-Tage alter Tiere; .....	57
Abb. 3-15: Vergleich Flächenanalyse $K_{Ca2.3}^{T/T}$ +/- DOX; .....	58
Abb. 3-16: Vergleich Flächenanalyse $K_{Ca2.3}^{T/T}$ / $K_{Ca3.1}^{-/-}$ +/- DOX.....	58
Abb. 3-17: Vergleich Verzweigungen $K_{Ca2.3}^{T/T}$ +/- DOX; .....	60
Abb. 3-18: Vergleich Verzweigungen $K_{Ca2.3}^{T/T}$ / $K_{Ca3.1}^{-/-}$ +/- DOX.....	60



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 ANGIOGENESEPROZESSE

Generell werden heute drei Arten von Gefäßbildung unterschieden, Angiogenese, Vaskulogenese und Arteriogenese. Die jeweiligen Arten basieren auf ähnlichen und auch unterschiedlichen Prinzipien sowie zellulären und molekularen Mechanismen. Diese Prozesse sind wichtig für die Embryonalentwicklung des Blutgefäßsystems, aber auch für Gefäßneubildungsprozesse im adulten Organismus. Von medizinischer Relevanz sind sie unter Anderem bei malignen Erkrankungen, Adaptations- und Reparaturmechanismen und entzündlichen Erkrankungen. Leider werden diese drei Begriffe nach wie vor nicht immer einheitlich verwendet und stattdessen häufig die Angiogenese als Überbegriff für alle Arten der Gefäßneubildung verwendet. Daher sollen im Folgenden zunächst die unterschiedlichen, anerkannten Gefäßbildungsprozesse (Carmeliet 2000, 2004; Semenza und Gregg 2007) differenziert erläutert werden.

### 1.1.1 VASKULOGENESE

Der Begriff Vaskulogenese wurde unter Anderem von dem Deutschen Werner Risau entscheidend geprägt und beschreibt die Neubildung von Blutgefäßen aus hämatopoetischen Stammzellen und damit die vorherrschende Gefäßneubildung in der embryonalen Entwicklung (Risau und Flamme 1995). Die EPC's (endothelial progenitor cells, endotheliale Vorläuferzellen) aggregieren zu Inseln, wobei sich die äußeren Zellen zu EC's (Endothelial cells, Endothelzellen) differenzieren und zu einem primitiven Kapillargeflecht zusammenschließen. Die Anlagerung von weiteren Zellen wird hauptsächlich über Zytokine und Wachstumsfaktoren gesteuert. Die meisten Organe, die aus Meso- und Entoderm, also unter anderem Leber, Milz und Herz, entstehen, werden durch Vaskulogenese mit Blutgefäßen ausgestattet. Auch am embryonalen Gefäßwachstum in Niere und Lunge sind unter anderem Vaskulogeneseprozesse beteiligt.

Bis vor wenigen Jahren ging man davon aus, dass im adulten Organismus keine Vaskulogenese mehr stattfindet, jedoch konnte gezeigt werden, dass EPC's auch im adulten Blut und Knochenmark vorkommen und dass die Neubesiedlung von adultem Gewebe aus einem nebeneinander von Vaskulo- und Angiogeneseprozessen besteht. Die postnata-

Die Neubildung von Gefäßen durch Differenzierung adulter Stammzellen nennt man De-novo Vaskulogenese (Kassmeyer, Plendl et al. 2009). Sowohl in der prä- als auch in der postnatalen Phase spielen VEGF (Vascular Endothelial Growth Faktor, vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor), FGF (Fibroblast Growth Factor, fibroblastischer Wachstumsfaktor) und Angiopoietin eine übergeordnete Rolle für die oben beschriebenen Prozesse (Carmeliet 2000).

### **1.1.2 ANGIOGENESE**

Die Angiogenese basiert auf der Ausweitung des Gefäßnetzes durch vorhandene, differenzierte Endothelzellen. Dabei unterscheidet man zwei Prinzipien, zum einen das Ausprossens von Gefäßen (sprouting angiogenesis) aus der vorhandenen Kapillare, zum anderen das Einstülpfen und Aufsplitten einer existierenden Kapillare (non sprouting angiogenesis oder intussusception) (Risau 1997). Als entscheidend zum Starten dieser Vorgänge wird heute eine Gewebshypoxie angesehen, bei der es über verschiedene Transkriptionsfaktoren, unter anderem HIF (Hypoxia Inducible Factor, Hypoxie induzierten Faktor) zur Expression verschiedener Wachstumsfaktoren kommt. Im Mittelpunkt steht hierbei VEGF, welcher einen wichtigen Differenzierungs- und Wachstumsstimulus für Endothelzellen darstellt und zusätzlich eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität und eine NO (Nitro Oxygen, Stickstoffmonoxid) -vermittelte Gefäßdilatation verursacht (Nikol, Pelisek et al. 2002). Diese Vorgänge sind wichtig, um eine erhöhte Plasmaprotein-Extravasion zu ermöglichen. Zu diesen gehören Matrixmetalloproteasen und Plasminogenaktivatoren, die eine Lyse der Basalmembran und der extrazellulären Matrix verursachen, damit in der Folge ein neuer endothelialer Kapillarspross in Richtung des angiogenen Stimulus gebildet werden kann (Kalka, Asahara et al. 2000). Im weiteren Verlauf kommt es dann unter dem Einfluss von PDGF (Platelet Derived Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor) und anderen Faktoren zur Besiedlung der ‚nackten‘ Endothelzell-Röhren mit Perizyten und SMC (smooth muscle cells, glatten Gefäßmuskelzellen) (Carmeliet 2004)

Embryonale Angiogeneseprozesse sind in Organen ektodermalen Ursprungs, unter anderem im ZNS, zu dem auch die Retina gehört, vorherrschend (Kassmeyer, Plendl et al. 2009).

### 1.1.3 ARTERIOGENESE

Arteriogenese beschreibt den Umbau von kleinen Arteriolen zu deutlich kaliberstärkeren, funktionell bedeutsamen Arterien. Hauptstimulus für diese Art von Gefäßbettveränderungen ist der sogenannte „shear stress“, das sind Scherkräfte, die durch den Blutfluss auf die Gefäßwände ausgeübt werden. Kommt es beispielsweise zur Stenosierung eines Gefäßes, folgt in den benachbarten Blutgefäßen eine Erhöhung des Blutflusses und daraus resultierend ein Abfall des Perfusionsdrucks mit Vasodilatation und shear stress in den Gefäßwänden. Als Reaktion darauf induziert das Endothel eine entzündungsähnliche Reaktion, indem unter anderem Faktoren wie NO, HIF sowie MCP (Monocyte Chemotactic Protein) sezerniert werden und vor allem Monocyten angelockt werden (Schaper und Buschmann 1999). Diese beginnen mit einer proteolytischen Degradation der extrazellulären Matrix unter anderem mit TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ , Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ) um zunächst die Gefäßintegrität aufzulösen. Zusätzlich kommt es zur Freisetzung bekannter pro-angiogenetischer Wachstumsfaktoren wie bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) und darunter zur Proliferation von EC's und nachfolgender Anlagerung von SMC (smooth muscle cells, glatter Gefäßmuskelzellen) wodurch eine erhebliche Vergrößerung, bis zu 30fach, des Gefäßdurchmessers erreicht werden kann (Carmeliet 2000). Diese Art der Gefäßbildung ist vor allem aus medizinischer Sicht für obstruierende Vorgänge beispielsweise im Gehirn wichtig um auf eine Minderversorgung adäquat mit der Ausbildung von grossvolumigen und stabilen Kollateralen zu reagieren (Scholz, Cai et al. 2001). Wichtig für diesen Vorgang ist das Vorhandensein von Arteriolen von Beginn an – dem gegenüber spielen Ischämie/Hypoxie oder Mediatoren wie VEGF und PDGF anders als bei der Angiogenese anscheinend keine große Rolle (Schaper und Scholz 2003).

Da sich die vorliegende Arbeit vor allem mit Angiogeneseprozessen in der Retina beschäftigt, soll im Folgenden nach einer kurzen Einführung in die Augenentwicklung im Allgemeinen, speziell auf die Gefäßentwicklung im Auge eingegangen werden.

## 1.2 AUGENENTWICKLUNG

Die Augen entwickeln sich bei Vertebraten aus dem Ektoderm, indem sich Teile des Prosencephalon ausstülpfen und Augenfurchen (sulci optici) bilden. Daraus entwickeln sich die Augenbläschen, die sich im weiteren Verlauf zu den doppelblättrigen Augenbechern (Cupula optica) eindellen, in deren Zwischenraum die embryonale Arteria und Vena Hyaloidea verläuft. Das äußere, zum Mesenchym gelegene Blatt des Augenbeckers wird zum einschichtigen Pigmentepithel, während sich das innere Blatt zur vielschichtigen Retina (Stratum nervosum retinae) differenziert. In den freien Raum zwischen sich entwickelnder Retina und Linse wandern Mesenchymzellen ein und bilden den Glaskörper. Die Augenanlage ist schon in einem frühen Stadium ganz von Mesenchym umgeben. Dieses gliedert sich in 2 Schichten – aus der inneren entwickelt sich die Tunica vasculosa bulbi, welche sich aus Aderhaut (Choroidea), Ziliarkörper (Corpus ciliare) und Iris zusammensetzt und aus der äußeren Schicht wird die Tunica fibrosa bulbi, bestehend aus Sclera und Cornea (Drenckhahn, Asan et al. 2004)

### 1.2.1 GEFÄßENTWICKLUNG IM AUGE

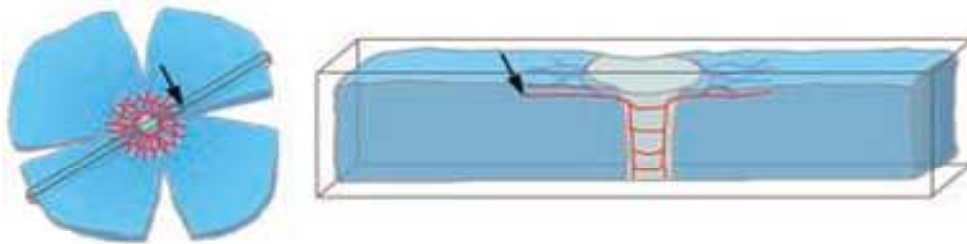
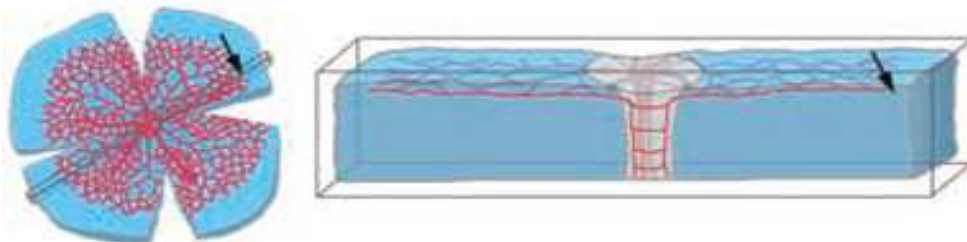
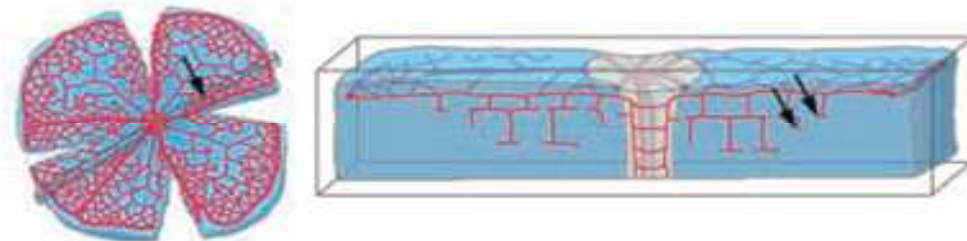
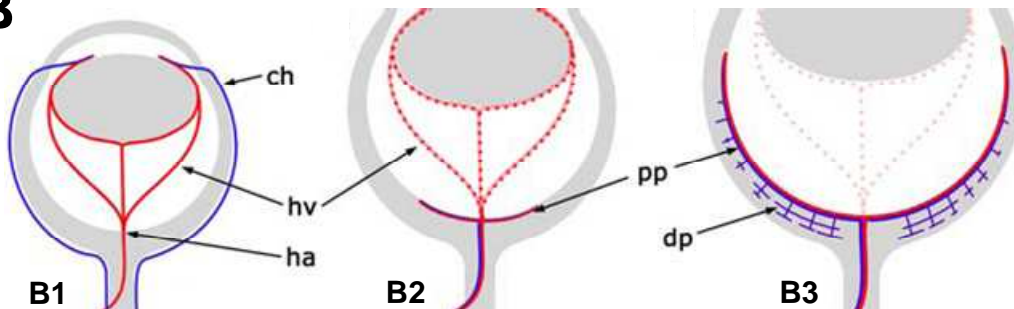
Relativ früh in der Entwicklung des Auges sprosst die A. Hyaloidea in den Glaskörper ein, versorgt über ein Netzwerk das sich entwickelnde Auge und tritt relativ weit anterior, peripher der Cornea wieder aus. Im späteren Verlauf bildet sich das hyaloide Gefäßsystem zurück und an dessen Stelle tritt die A. centralis retinae. Die Rückbildung findet beim Menschen in der mittleren Gestationsperiode statt, bei Mäusen jedoch erst postpartal. Im reifen Auge versorgt die A. centralis retinae allerdings nur die inneren 2/3 der Retina. Das äußere 1/3 bis zur äußeren plexiformen Schicht und damit die für die Sinnesaufnahme wichtigen Photorezeptoren, werden per diffusionem durch das Kapillarnetz der Choroidea (Lamina choroideocapillares), welches aus den Aa. Cilliales posteriores breves et longae gespeist werden, versorgt. Diese Diffusion muss durch die Bruch'sche Membran, welche die Basalmembran des Pigmentepithels darstellt und eine wichtige Rolle bei der Blut-Retina Schranke spielt, erfolgen (Drenckhahn, Asan et al. 2004).

Vorraussetzung für die erst postpartal beginnende Entwicklung des sehr ausgeprägten Gefäßsystems der murinen Retina aus der A. centralis retinae ist das Einwandern von

Astrozyten aus dem Nervus opticus. Diese werden durch PDGF angelockt und bilden ein feines Geflecht ähnlich dem späteren Gefäßnetz auf der Retina-Innenseite (Stone und Dreher 1987, Watanabe und Raff 1988; Uemura, Kusuhara et al. 2006). Sobald die proliferierenden Astrozyten die Peripherie erreichen, beginnen sie aufgrund der dort vorherrschenden Hypoxie geringe Mengen GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein, saures Gliafaserprotein) sowie hohe Dosen an VEGF, den wichtigsten stimulierenden Faktor der Angiogenese, zu exprimieren (West, Richardson et al. 2005). Durch komplizierte Regulierungsvorgänge kehrt sich dieses Verhältnis mit zunehmender Vaskularisierung um und es wird weniger VEGF und mehr GFAP sezerniert. Das wachsende Gefäßsystem entwickelt sich durch aussprossende Angiogenese (Risau 1997). An dieser Stelle sei erwähnt, dass andere Autoren der Meinung sind, die Entwicklung dieses primären Gefäßplexus geschehe hauptsächlich durch Vaskulogenese (Hughes, Yang et al. 2000). Jedoch sprechen einige Gründe dafür, dass Angiogenese die wahrscheinlichere Theorie ist, z.B. das Vorhandensein von so genannten Tip-Cells, spezialisierten Endothelzellen, die klassischerweise am äußeren Ende eines durch Aussprossung entstandenen Gefäßplexus nachgewiesen werden können (Gerhardt, Golding et al. 2003).

Ab Tag acht bis neun der Gefäßentwicklung beginnen Kapillaren erneut durch Aussprossen entlang von Müller-Zellen in die Tiefe der Retina zu wachsen und bilden zwei sekundäre, parallel zum primären, Gefäßplexus, welche sich direkt über- und unterhalb der inneren Körnerzellschicht befinden (**Abb. 1-1**). Über diese Angiogeneseprozesse ist wenig bekannt, außer das erneut ein VEGF-Gradient die treibende Kraft darstellt und dieser Prozess Astrozyten-unabhängig vonstatten geht (Fruttiger 2002, 2007). Die Vaskularisierung der Retina in der Maus mit ihren drei Plexus ist mit Tag 18 endgültig abgeschlossen. Dann werden wie schon erwähnt die inneren 2/3 der Retina von vier Hauptästen der A. centralis retinae versorgt. Anders als bei der hyaloiden Versorgung treten sowohl Arterie als auch Vene im Bereich des Nervus opticus in das Auge ein bzw. aus.

Durch die erst postpartal beginnende Gefäßentwicklung und die gute Erreichbarkeit und Darstellbarkeit der Netzhautgefäße hat sich die Retina in den letzten Jahrzehnten als ein Standardmodell zur Erforschung und Charakterisierung von Angiogeneseprozessen sowie physiologischer und pathologischer Mechanismen entwickelt.

**A****D1****D6****D9****B**

**Abb. 1-1: A: Gefäßentwicklung am Auge abhängig von der Zeit; Ab Tag acht fangen die Kapillaren an in die Tiefe zu wachsen und zwei weitere Plexus ober- und unterhalb der inneren Körnerzellschicht zu bilden. Abbildung modifiziert nach Gerhardt, Golding et al. 2003**

**B: Darstellung der einzelnen Gefäßnetze; B1: präpartal liegen nur die hyaloiden Gefäße vor (hv: hyaloide Vene; ha: hyaloide Arterie; ch: chorioidea); B2: postpartal beginnen die hyaloiden Gefäße sich zurückzubilden und der definitive Plexus wächst vom Zentrum aus in die Peripherie (pp: primary Plexus); B3: Der primäre Plexus hat die Peripherie erreicht, die hyaloiden Gefäße sind fast vollständig zurückgebildet, die inneren Plexus wachsen in die Tiefe (dp: deeper Plexus). Abbildung modifiziert nach Frutiger 2007**

### 1.3 IONENKANÄLE UND ANGIOGENESE

Wie bereits eingangs erwähnt, spielen vor allem Mediatoren wie FGF und VEGF eine entscheidende Rolle als Stimulus für Neoangiogeneseprozesse. Nach Bindung dieser Wachstumsfaktoren an ihre endothelialen Rezeptoren wird unter anderem über eine Tyrosinkinasefunktion die Proliferation der Zellen über MAPK (mitogenaktivierte Proteinkinase) -Signaltransduktionskaskaden und verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert. Eine zentrale Rolle bei der zellulären Antwort auf diese Stimuli spielt die Veränderung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenmilieus in der Zelle (Kohn, Alessandro et al. 1995). Neben der  $\text{IP}_3$  (Inositoltriphosphat)-getriggerten Freisetzung von intrazellulär gespeichertem Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum ist auch der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen von extrazellulär über genau geregelte Kanalaktivität wichtig für die Zellproliferation (Berridge 1995; Berridge, Lipp et al. 2000), Apoptose-Vorgänge (Preston, Barrett et al. 1997) und Angiogenese (Kohn, Alessandro et al. 1995). Es gibt Hinweise, dass auch  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanäle (Calcium-abhängige Kaliumkanäle) an diesen Vorgängen beteiligt sind.

In einer Vergleichsuntersuchung zu dem  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Expressionsmuster des Endothels zwischen Adenokarzinompatienten und einer gesunden Vergleichsgruppe konnte eine um den Faktor 2,5 erhöhte Expression des  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  gezeigt werden und daraus folgend eine deutlich erhöhte Hyperpolarisationsfähigkeit (Köhler, Degenhardt et al. 2000). Bereits zuvor wurde anhand des Serumspiegels eine deutliche Erhöhung von VEGF und bFGF in der gleichen Versuchsanordnung gezeigt (Dirix, Vermeulen et al. 1996). Der vermutete Zusammenhang zwischen proangiogenetischen Prozessen und einer Hochregulation des  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanals konnte inzwischen auch anhand einer Untersuchung an kultivierten humanen Endothelzellen gezeigt werden (Grgic, Eichler et al. 2005). Hier konnte festgestellt werden, dass die proangiogenetischen Mitogene bFGF und VEGF eine Hochregulation der Kanal-mRNA-Expression bewirken, die über die Ras/Raf/MEK/ERK-MAP-Kinase-Signalkaskade vermittelt werden. Des Weiteren zeigte diese Untersuchung, dass ein selektiver pharmakologischer Inhibitor TRAM-34 (Wulff, Miller et al. 2000) zum einen die Zellproliferation in vitro unterdrückt und zum anderen auch die Vaskularisierung eines Matrigel<sup>TM</sup>-plug-assays in vivo unterdrückt (Grgic, Eichler et al. 2005).

Eine weitere Studie zeigte, dass auch andere  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige  $\text{K}^+$ -Kanäle einen Einfluss auf die Gefäßmorphologie haben. So führte die Überexpression des  $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$  in transge-

nen  $K_{Ca2.3}^{+/+}$ -Tieren zu einer Zunahme der Gefäßverzweigung von mesenterialen Gefäßen sowie zu einer arteriellen Vasodilatation. Dies deutet darauf hin, dass der  $K_{Ca2.3}$  ebenfalls einen Einfluss auf Angiogeneseprozesse haben könnte (Taylor, Bonev et al. 2003).

Da sich diese Arbeit speziell mit endothelialen  $K_{Ca}$ -Kanälen beschäftigt, soll nun zunächst auf die molekularen und pharmakologischen Eigenschaften dieser Kanäle eingegangen werden.

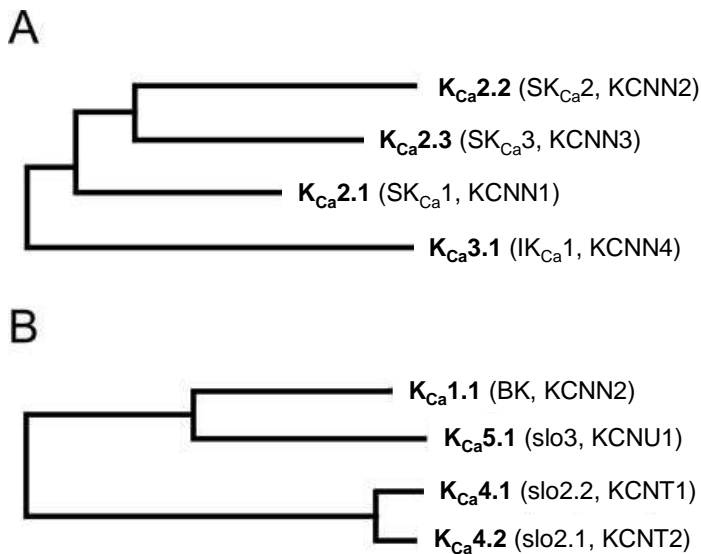
#### 1.4 $Ca^{2+}$ -AKTIVIERTE KALIUMKANÄLE ( $K_{Ca}$ ):

In diesem Kapitel soll die Familie der  $Ca^{2+}$ -aktivierten  $K^+$ -Kanäle und ihre Funktion vorgestellt werden. Die verschiedenen  $K_{Ca}$  unterscheiden sich hinsichtlich Einzelkanalleitfähigkeiten, Aktivierungsmechanismen und Verteilungsmustern in den verschiedenen Zelltypen und Geweben.

Die erste Einteilung der  $K_{Ca}$  erfolgte bereits 1987 auf Grundlage ihrer pharmakologischen und physiologischen Eigenschaften in drei Untergruppen: 1. big  $K_{Ca}$  ( $BK_{Ca}$  für big conductance, Gen: SLO) mit hoher Leitfähigkeit von 165 – 240 pS. 2. intermediate  $K_{Ca}$  ( $IK_{Ca}$ , intermediate conductance; Gen: IKCa1 oder SK4) mit einer intermediären Leitfähigkeit von 30 - 40 pS und 3. small  $K_{Ca}$  ( $SK_{Ca}$ , small conductance; Gen: SK1-3) mit einer niedrigen Leitfähigkeit von 10 pS (Ling und O'Neill 1992; Rusko, Tanzi et al. 1992; Hoyer, Distler et al. 1994; Haburcák, Wei et al. 1997; Suh, Vennekens et al. 1999).

Nach der neuen Nomenklatur (Gutman, Chandy et al. 2003; Wei, Gutman et al. 2005) werden die Kanäle anhand ihrer Aktivierbarkeit und genetischen Ähnlichkeit in zwei Gruppen eingeteilt (**Abb. 1-2**). In dieser Arbeit sollen vor allem die Kanäle der Gruppe A betrachtet werden. Diese haben gegenüber der Gruppe B gemein, dass sie nicht spannungsabhängig sind und bereits durch niedrige intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen von  $<1.0 \mu M$  aktiviert werden (Kohler, Hirschberg et al. 1996; Ishii, Silvia et al. 1997; Wei, Gutman et al. 2005). Die Expression dieser Kanäle zeigt eine ausgeprägte Heterogenität in unterschiedlichen Endothelzell-Klassen (Nilius, Viana et al. 1997)





**Abb. 1-2: Phylogenetischer Stammbaum von K<sub>Ca</sub>-Kanälen; A:** Subfamilie der spannungsunabhängigen Calmodulin-regulierten K<sub>Ca</sub>-Kanäle mit geringer und mittlerer Leitfähigkeit; **B:** Subfamilie der spannungsabhängig regulierten K<sub>Ca</sub>-Kanäle. **Abbildung modifiziert nach Wei, Wulff et al. 2005**

#### 1.4.1 K<sub>Ca</sub>3.1 (IK<sub>Ca</sub>, INTERMEDIATE CONDUCTANCE)

Dieser K<sub>Ca</sub>-Kanal mittlerer Leitfähigkeit wurde bereits 1956 in Erythrozyten beschrieben, in denen er zur Regulation des Membranpotentials beiträgt (Gardos 1956). Er besteht aus einem Homotetramer mit jeweils sechs Transmembrandomänen, wobei sowohl der N- als auch der C-Terminus des Proteins intrazellulär liegen. Die K<sup>+</sup>-selektive Pore liegt zwischen den Segmenten S5 und S6. Wie bereits erwähnt trägt der Kanal keinen Spannungssensor, stattdessen liegt das Protein CaM (Calmodulin) an den proximalen C-Terminus jeder Untereinheit gebunden und bildet durch seine EF-Hand - ein Aminosäuremotiv in Proteinen welches Ca<sup>2+</sup>-bindet - eine hochsensitive Detektionsstelle für Ca<sup>2+</sup>. Zur Öffnung des Kanals ist es nötig, dass CaM induzierte Konformationsänderungen an allen vier Untereinheiten stattfinden (Fanger, Ghanshani et al. 1999). Für die Öffnung ist also ein Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration nötig. Die EC<sub>50</sub> also die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration bei der die Hälfte der Kanäle geöffnet sind, liegt bei ungefähr 250 nM. Die Leitfähigkeit des Kanals beträgt ca. 35 pS (Ishii, Sylvia et al. 1997; Logsdon, Kang et al. 1997).

Bedeutung hat der Kanal bei immunologischen Prozessen. So wird die Expression dieses Kanals bei Aktivierung des Proteinkinase C Wegs sowie der intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Kaskade, welche eine frühe Antwort der T-Zell Aktivierung darstellen, hochreguliert (Ghanshani, Wulff et al. 2000). Des Weiteren konnte durch unselektive Blockade des

K<sub>Ca</sub>3.1 eine verminderte Freisetzung von IFN- $\gamma$  (Interferon  $\gamma$ ) aus T-Zellen in vitro erreicht werden, was ein mögliches pharmakologisches Ziel für eine immunsuppressive Therapie darstellen könnte (Jensen, Odum et al. 1999).

Im Bronchialepithel ist der Kanal zusammen mit dem CFTR-Kanal, ein cAMP-aktivierter CL<sup>-</sup>-Kanal, dessen Verlust bei verschiedenen Krankheiten wie z.B. der cystischen Fibrose eine entscheidende Rolle spielt, am Wassertransport und damit an der Mucussekretion beteiligt (Vázquez, Nobles et al. 2001).

In der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass dieser Kanal von potentieller Bedeutung bei Angiogeneseprozessen ist. Der K<sub>Ca</sub>3.1 ist unter anderem durch die vermittelte Hyperpolarisation und die damit einhergehende Steigerung der elektrochemischen Triebkraft für den Ca<sup>2+</sup> Einstrom wichtig für die Proliferation von Fibroblasten und Endothelzellen (Köhler, Degenhardt et al. 2000). Die Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF erhöhen die Expression des Kanals über eine Aktivierung der Ras/Raf/MEK/ERK-MAP-Kinase-Signalkaskade und Bindung des Aktivatorproteins 1 (AP1) an die Promoterregion des Kanalgens (Grgic, Eichler et al. 2005; Köhler, Kaistha et al. 2010). In Nature Medicine wurde bereits 1995 ein Artikel veröffentlicht, dass das Breitbandmykotikum Clotrimazol, ein Inhibitor des K<sub>Ca</sub>3.1, zur Hemmung der Endothelzellproliferation in vitro und in vivo führt. Die Mechanismen waren jedoch unklar, da Clotrimazol auch das P450-Enzym, ein ubiquitär vorkommendes Enzym der Cytochrom-Familie, hemmt, welches in einer Vielzahl von Stoffwechselwegen einbezogen ist (Benzaquen, Brugnara et al. 1995). Grgic et al. aus der eigenen Arbeitsgruppe zeigten 2005, dass durch die Stimulation von FGF und VEGF die Expression des K<sub>Ca</sub>3.1 in Endothelzellen signifikant hochreguliert wird und es zu einer ausgeprägten Fibroblasten- und Endothelzellproliferation kommt. Diese Proliferationen konnten durch die Gabe von Clotrimazol und TRAM-34, ein mit Cotrimazol verwandter, selektiver Blocker des K<sub>Ca</sub>3.1, wirkungsvoll unterdrückt werden. In vivo gelang es ebenfalls durch TRAM-34-Blockade von K<sub>Ca</sub>3.1 die Restenose nach Ballonkatheterisierung der A. carotis in der Ratte zu inhibieren, was somit potentielle neue Therapieverfahren bei kardialen Erkrankungen ermöglichen könnte (Köhler, Wulff et al. 2003). Ferner gelang es im Mausmodell die Proliferation und Angiogenese von Endothelzellen innerhalb eines Matrigel<sup>TM</sup>-plug-assay, welches eine etablierte Methode zur Bestimmung und zum Vergleich von in vivo-Angiogeneseprozessen im adulten Tier darstellt (Kragh, Hjarnaa et al. 2003),

durch die TRAM-34-Blockade von  $K_{Ca3.1}$  um ~85% zu reduzieren. (Grgic, Eichler et al. 2005)

#### 1.4.2 $K_{Ca2.X}$ ( $SK_{Ca}$ , SMALL CONDUCTANCE)

Die Familie der  $Ca^{2+}$  abhängigen Kanäle niedriger Leitfähigkeit setzt sich aus 3 Unterformen zusammen ( $K_{Ca2.1}$ , 2.2, 2.3) und hat eine ca. 50%ige genetische Homologie zum bereits erwähnten  $K_{Ca3.1}$ . Der molekulare Aufbau der  $K_{Ca2.X}$  Kanälen entspricht weitgehend dem  $K_{Ca3.1}$ . Unterschiede gibt es in der  $Ca^{2+}$ -Sensitivität und der  $K^{+}$ -Leitfähigkeit. Bei hohen intrazellulären  $K^{+}$ -Konzentrationen liegt eine Einzelkanalleitfähigkeit von 4-10 pS vor. Am C-terminalen Ende jeder der 4 Untereinheiten ist analog zum  $K_{Ca3.1}$  CaM gebunden, welches die  $Ca^{2+}$  Sensitivität vermittelt. (Stocker 2004). Gemeinsamkeiten und Unterschiede sowie die pharmakologischen Eigenschaften (Blocker und Aktivatoren) sind in Tabelle 1 dargestellt.

	<b>K<sub>Ca</sub> 2.X (SK1-3)</b>	<b>K<sub>Ca</sub> 3.1 (SK4/IK)</b>
<b>Untereinheiten</b>	Porenbildende Homotetramere 6 transmembrandomänen Calmodulin (4)	Porenbildende Homotetramere 6 transmembrandomänen Calmodulin (4)
<b>Gene</b>	KCNN1 (K <sub>Ca</sub> 2.1) KCNN2 (K <sub>Ca</sub> 2.2) KCNN3 (K <sub>Ca</sub> 2.3)	KCNN4 (K <sub>Ca</sub> 3.1)
<b>Spannungsabhängig</b>	Nein	Nein
<b>Calcium-Sensitiv</b>	Ja (Calmodulin)	Ja (Calmodulin)
<b>Leitfähigkeit</b>	4-10 pS	32-39 pS
<b>EC50</b>	~250 nM Ca <sup>2+</sup>	~250 nM Ca <sup>2+</sup>
<b>Aktivatoren</b>	Riluzol, NS 309, 1-EBIO/DC-EBIO, Chlorzoxazon	Riluzol, NS 309, 1-EBIO/DC-EBIO, Chlorzoxazon
<b>Blocker</b>	Apamin, UCL 1684, Bicucullin, Dequalinium, TEA+	Charybdotoxin, TRAM-34, Clotrimazole, TEA+
<b>Bedeutung im Endothel</b>	Ca <sup>2+</sup> -abhängige Hyperpolarisation, Endothelfunktion (EDHF-Signalgebung) Blutdruckregulation	Ca <sup>2+</sup> -abhängige Hyperpolarisation, Endothelfunktion (EDHF-Signalgebung) Blutdruckregulation Angiogeneseprozesse

**Tabelle 1: Unterschiede zwischen K<sub>Ca</sub> mittlerer und geringer Leitfähigkeit; Modifiziert nach Ledoux, Werner et al. 2006**

Die K<sub>Ca</sub> niedriger Leitfähigkeit werden in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, unter anderem im Zentralen Nervensystem wo sie möglicherweise einige Pathologien mitverursachen, z.B. Schizophrenien und bipolare Störungen (Chandy, Fantino et al. 1998; Cardno, Bowen et al. 1999), Anorexia Nervosa (Koronyo-Hamaoui, Danziger et al. 2002) sowie Ataxien (Figuerola, Chan et al. 2001).

K<sub>Ca</sub>2.3 wird auch im Endothel exprimiert und es konnte gezeigt werden, dass dieser Kanal für die endothelabhängige Vasoregulation von Bedeutung ist, indem er durch die Erzeugung einer Hyperpolarisation des Endothels mit darauf folgender Hyperpolarisation von SMC's (smooth muscle cells, glatte Muskelzellen) an Vasodilatationsprozessen beteiligt ist (Grgic, Kaistha et al. 2009).

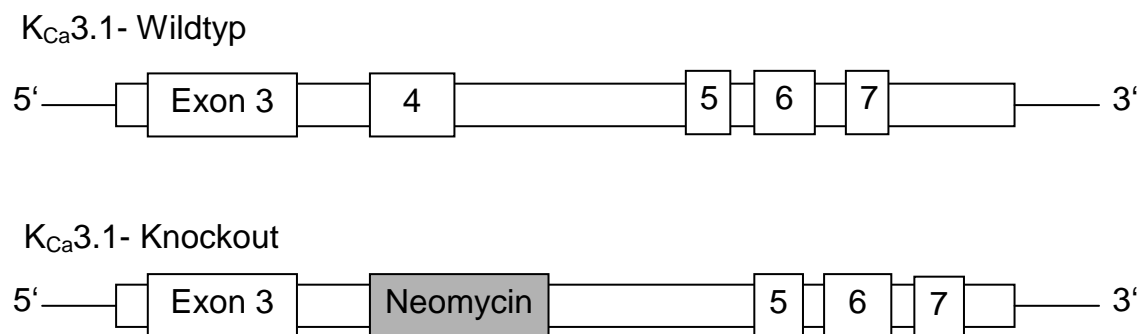
## 1.5 MAUSMODELLE ZUR CHARAKTERISIERUNG VON K<sub>Ca</sub>

Zur weiteren Charakterisierung der K<sub>Ca</sub>-Kanäle wurden in der Zwischenzeit verschiedene transgene Tiermodelle erzeugt, in denen entweder durch KO (Knockout) des kanal-kodierenden Gens oder durch Modifikation des Promoters Mausmutanten mit spezifischen Eigenschaften entstanden sind. Zusammen mit der pharmakologischen Inhibition der Kanäle spielen diese transgenen Tiere eine wichtige Rolle zum Verständnis und zur Aufklärung der zellulären und molekularen Mechanismen. Auf die verschiedenen Arten und Besonderheiten dieser transgenen Tiere, die in dieser Arbeit eine zentrale Rolle einnehmen, soll im Folgenden eingegangen werden.

### 1.5.1 K<sub>Ca</sub>3.1<sup>-/-</sup> TRANSGENES MAUSMODELL

Zur Herstellung einer K<sub>Ca</sub>3.1<sup>-/-</sup> transgenen Maus wurden in der eigenen Arbeitsgruppe Genteile des K<sub>Ca</sub>3.1 Kanals mittels PCR aus ES (embryonalen Stammzellen) amplifiziert. Anschließend wurde ein auf das Intron oberhalb von Exon 4 und die Exone 5-7 passender Vektor hergestellt, der an seinem 3'-Ende eine Neomycin-Resistenzgen-Kassette trägt um im fertigen Produkt einen Austausch des Exon 4 durch diese Kassette zu erreichen (**Abb. 1-3**). Das Vorhandensein der richtigen Mutante wurde in den ES mittels PCR überprüft und ein korrekter Klon in eine C57BL/6 Blastocyste injiziert. Die so erzeugten lebensfähigen Mäuschimären wurden mit Wildtyp C57BL/6 Mäusen verpaart und zeugten ebenfalls unauffällige heterozygote Nachkommen gemäß den Mendelschen Regeln. Die Nachkommen der ersten Generation wurden wiederum untereinander verpaart, wodurch ab der zweiten Generation homozygote K<sub>Ca</sub>3.1<sup>-/-</sup> Nachkommen in statistisch 25% der Fälle auftraten. Die erzeugten K<sub>Ca</sub>3.1<sup>-/-</sup> transgenen Mäuse waren lebensfähig und fertil und zeugten wiederum homozygoten Nachwuchs, wodurch eine reine Linie K<sub>Ca</sub>3.1<sup>-/-</sup> Knockouttiere entstand.

Durch den Ersatz des Exon 4 des nativen, 9 Exone umfassenden,  $K_{Ca3.1}$  durch das 160 Bp längere Neomycin-Resistenz-Gen wurde ein Teil der Sequenz, welches für die Kanalpore kodiert, deletiert, was zu einem Verlust der Kanalfunktion führt. Der Verlust des Kanalproteins konnte mittels Western-Blot-Analysen an Erythrozyten nachgewiesen werden, die den Kanal (dort bekannt als Gardos-Kanal) aufweisen. (Si, Heyken et al. 2006)



**Abb. 1-3: Genstruktur des  $K_{Ca3.1}$ -Wildtypgens und des  $K_{Ca3.1}$ -Knockoutgens.** Dargestellt sind die Exone 3-7. Im  $K_{Ca3.1}$ -Knockoutgen wurde das Exon 4 durch ein Neomycin-Resistenzgen ersetzt. **Abbildung modifiziert nach Si, Heyken et al. 2006.**

### 1.5.2 $K_{Ca2.3}^{T/T}$ TRANSGENES MAUSMODELL

Ein anderer Weg wurde bei der Generierung einer transgenen  $K_{Ca2.3}^{T/T}$  Mutante beschritten. Hier gelang es, zwischen nativem Promoter und der  $K_{Ca2.3}$ -kodierenden Sequenz eine regulatorische Kasette in die nicht translatierte 5'-Region einzufügen. Diese besteht aus 3 funktionellen Einheiten:

1. binärer tTA (Tetrazyklin Transaktivator)
2. bakterielles Neomycin Resistenz-Gen
3.  $tet_{05}$ CMV (Tetrazyklin-sensitiver CMV-Promoter)

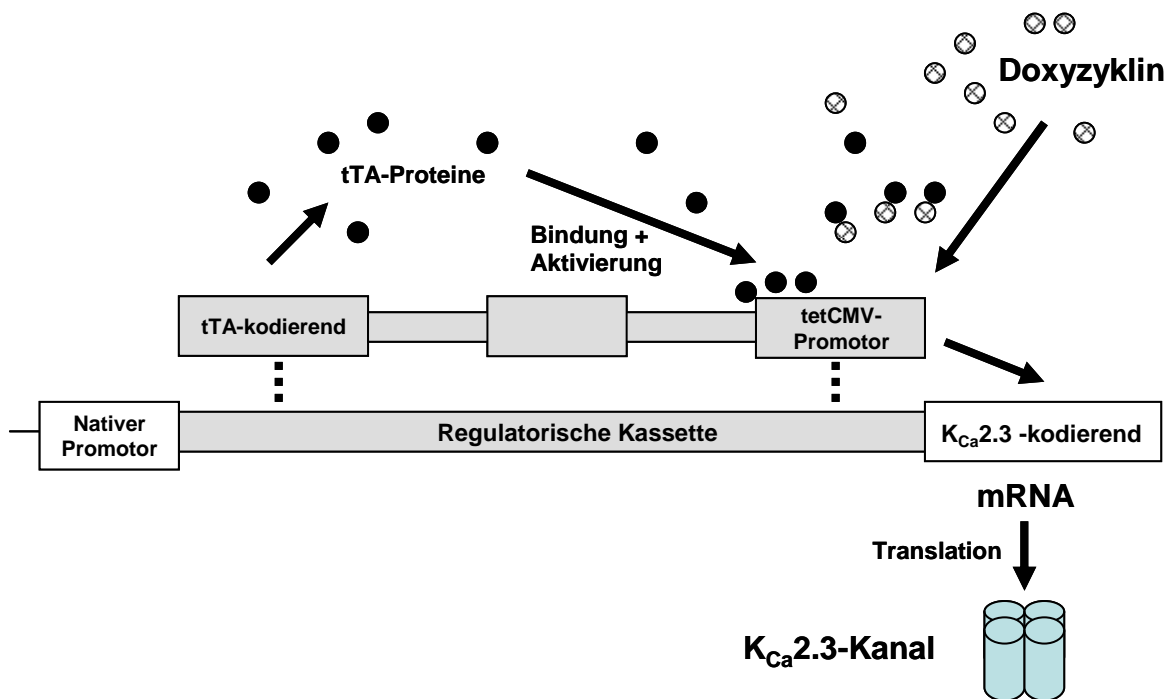
Bei der normalen, endogen-regulierten Transkription des Gens wird nun zunächst ein DNA-bindendes tTA-Protein hergestellt, direkt im Anschluss folgt ein SV 40 (Simian-Virus 40) polyA Terminationskodon. Die als Dimer vorliegenden tTA Proteine binden an die insgesamt fünf Kopien des  $tet_{05}$ CMV-Promoters und stellen einen starken Stimulus dar, wodurch das nachfolgende  $K_{Ca2.3}$ -Gen circa dreifach überexprimiert wird. Bei Zugabe von DOX (Doxyzyclin), einem sehr gut zellgängigen Antibiotikum über das Trinkwasser, kommt es zu einer Bindung von DOX an das dimerisierte tTA und somit

zu einer Verhinderung der Bindung an den tet<sub>05</sub>CMV-Promoter. Dadurch folgt eine praktisch vollständige Suppression der K<sub>Ca</sub>2.3-Kanalexpression (**Abb. 1-4**). Man erhält dadurch eine an- und ausschaltbare Expression des K<sub>Ca</sub>2.3-Kanals und somit beste genetische Voraussetzungen die Eigenschaften des Kanals besser zu erforschen (Bond, Sprengel et al. 2000).

Die übrigen Teile der regulatorischen Kasette bestehen aus einem Neomycin-Resistenzgen mit eigenem Promoter TKprom (herpes simplex virus thymidin kinase Promoter), sowie des URA3-Gens, beide sind häufig verwendete Selektionsmarker für den Integrationsprozess. Dahinter folgt ein humanes Wachstumshormon polyA Terminationskodon.

Durch PCR, RT-PCR, Western- und Northern Blot aus dem Gehirn konnte nachgewiesen werden, dass ohne DOX eine Überexpression des K<sub>Ca</sub>2.3 stattfindet, nach Zugabe von DOX über das Trinkwasser für 4 Tage eine nahezu vollständige Suppression des Kanals vorliegt. Auch hier gelang es gemäß den Mendelschen Vererbungen homozygote Linien zu züchten, die lebensfähig und vom Phänotyp her bis auf zwei Ausnahmen unauffällig sind. Zum einen kam es vereinzelt zu Problemen mit der Austreibung während der Geburt bei starker Überexpression von K<sub>Ca</sub>2.3, was teilweise zum Tod sowohl der Muttertiere als auch der Feten führte. Unter Zugabe von DOX 2-10 Tage vor der Geburt traten diese Probleme nicht auf und der Geburtsvorgang verlief normal. Wahrscheinlich ist diese Besonderheit auf reflektorische periphere Wirkungen des Kanals zurückzuführen – im Uterus konnte mittels Western Blot eine hohe Proteindichte von K<sub>Ca</sub>2.3 nachgewiesen werden – jedoch ist auch eine zentrale Ursache auf Hirnstammebene nicht auszuschließen. Wie erwartet hatten auch die Jungtiere keine Expression von K<sub>Ca</sub>2.3, wenn die Muttertiere Doxyzyklin bekamen, da dieses Antibiotikum bekanntermaßen plazentagängig ist.

Eine weitere phänotypische Besonderheit war eine nach kurzer Zeit (30 – 45s) stark herabgesetzte Atemarbeit bis hin zu Apnoe-Phasen bei hypoxischer Belastung und Überexpression von K<sub>Ca</sub>2.3. Dieses Phänomen konnte durch die Zugabe von DOX ebenfalls unterdrückt werden. Eventuell könnten sich hier neue therapeutische Möglichkeiten zur Behandlung der Schlafapnoe bzw. des plötzlichen Säuglingstodes ergeben (Bond, Sprengel et al. 2000).



**Abb. 1-4: Schema des Doxyzyklin-sensitiven  $K_{Ca}2.3^T$ -Gens;** Eine regulatorische Kasse wurde zwischen nativem Promotor und  $K_{Ca}2.3$ -kodierender Untereinheit eingefügt. Entscheidende Komponenten sind eine tTA-Protein (Tetrazyklin-transaktivierendes Protein) kodierende Sequenz sowie ein Tetrazyklin-sensitiver CMV-Promotor. Das tTA-Protein wird exprimiert, bindet an den tetCMV-Promotor und führt so zur (Über-)Expression des  $K_{Ca}2.3$ -Kanals. Doxyzyklin bindet fest an das tTA-Protein und verhindert die Bindung an den Promotor, wodurch keine Expression des Ionenkanals stattfindet. **Abbildung modifiziert nach Bond et. al. 2000.**

### 1.5.3 $K_{Ca}3.1^{-/-}/K_{Ca}2.3^{T/T}$ DOPPELTRANSGENES MAUSMODELL

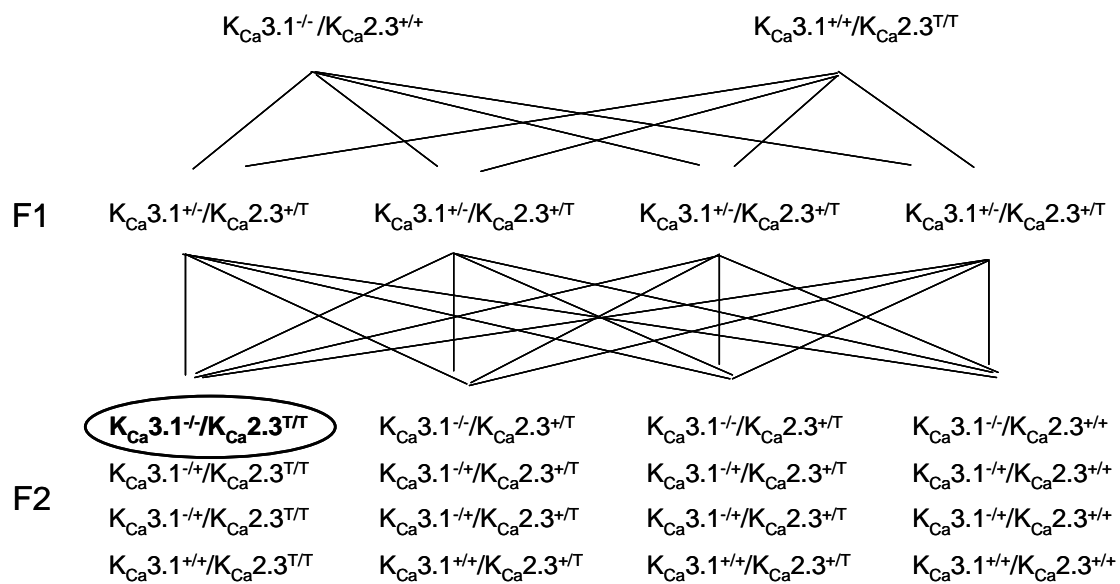
Zur Generierung eines  $K_{Ca}3.1^{-/-}/K_{Ca}2.3^{T/T}$  Mausmodells wurden in der eigenen Arbeitsgruppe homozygote  $K_{Ca}3.1^{-/-}$  Tiere mit homozygoten  $K_{Ca}2.3^{T/T}$  Tieren verpaart. Die Gene liegen auf verschiedenen Chromosomen, wodurch eine unabhängige Vererbung gemäß den Mendelschen Regeln stattfindet. Da beide Eltern homozygot für ein Gen ( $K_{Ca}3.1^{-}$  bzw.  $K_{Ca}2.3^T$ ) sind, entstehen in der F1-Generation Tiere die ausschließlich heterozygot für beide Gene sind ( $K_{Ca}3.1^{+/-}/K_{Ca}2.3^{+T}$ ). Aus Zuchtpaaren dieser F1-Generation entstehen homo- und heterozygote Tiere gemäß der Verteilung 1:2:1 für beide Gene. Jeweils  $\frac{1}{4}$  der Tiere sind homozygot für das  $K_{Ca}3.1$ -Wild-Allel und das Knockout-Allel und  $\frac{2}{4}$  sind heterozygot. Im selben Verhältnis 1:2:1 verteilen sich auch die Genotypen für das  $K_{Ca}2.3$ -Gen. Da die beiden Gene unabhängig voneinander vererbt werden, ergeben sich so bei  $\frac{1}{16}$  oder 6,25% der F2-Generation der für beide Gene erwünschte homozygote Genotyp  $K_{Ca}3.1^{-/-}/K_{Ca}2.3^{T/T}$  (**Abb. 1-5**). Western Blot Analysen konnten zeigen, dass der  $K_{Ca}3.1$  wie erwartet von Geburt an nicht exprimiert wird und



der  $K_{Ca2.3}$  abhängig von der Doxycyclin-Gabe überexprimiert bzw. nicht exprimiert wird. Somit konnte erfolgreich ein transgenes Tiermodell etabliert werden, bei dem die Auswirkungen des Fehlens zweier  $K_{Ca}$ -Kanal erforscht werden kann (Brähler, Kaistha et al. 2009).

Die Tiere wurden spätestens 23 Tage post partum vom Muttertier entwöhnt und nach Geschlecht getrennt. Nach Markierung der Tiere folgte die Genotypisierung anhand der Schwanzspitze und es konnte die erwartete Verteilung gezeigt werden. Phänotypisch und während der Zucht waren die Tiere sowohl unter DOX-Gabe, als auch ohne, makroskopisch unauffällig.

Um eventuellen Problemen der Austreibung aus dem Geburtskanal während der Geburt vorzubeugen, wurde auch diesen Tieren mindestens 5 Tage vor der Geburt DOX ins Trinkwasser zugegeben (Brähler, Kaistha et al. 2009).



**Abb. 1-5: Vererbungsschema für das  $K_{Ca3.1}$  und das  $K_{Ca2.3}^T$ -Gen;** Gemäß der Mendelschen Vererbungslehre entstehen in der Generation F1 nur heterozygote Tiere, während in der Generation F2 homo- und heterozygote Tiere in der Verteilung 1:2:1 entstehen. Für 2 voneinander unabhängige Gene ergibt sich somit in jedem 16ten Tier der F2-Generation der gewünschte homozygote Genotyp  $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T}$

## 1.6 ZIELSETZUNG

K<sub>Ca</sub>3.1 und K<sub>Ca</sub>2.3 vermitteln im Endothel eine Hyperpolarisation und beeinflussen dadurch die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Homöostase durch die Erhöhung der elektrischen Triebkraft für einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom. Des Weiteren sind diese Kanäle an der Volumenregulation der Zelle beteiligt. Veränderungen der Ca<sup>2+</sup>-Homöostase und Volumenregulation spielen eine wichtige Rolle bei Zellproliferationsprozessen, wobei Hinweise bestehen, dass die beiden Kanäle funktionelle Bedeutung bei Angiogenese- und Endothelzellproliferationsprozessen haben könnten. Durch die selektive Blockade von K<sub>Ca</sub>3.1 konnte eine Verminderung der Vaskularisierung in einem Matrigel<sup>TM</sup>-plug-assay um 85% erreicht werden (Grgic, Eichler et al. 2005). Des Weiteren wurden bei K<sub>Ca</sub>2.3<sup>T/T</sup>-Tieren eine veränderte Gefäßmorphologie beobachtet (Taylor, Bonev et al. 2003). Eine systematische Untersuchung dieser Beobachtungen wurde bisher jedoch noch nicht angestellt.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, inwiefern Angiogeneseprozesse durch den spezifischen Knockout eines oder beider K<sub>Ca</sub> beeinflusst sind. Die genetische Manipulation der Kanalexpression ist aussagekräftiger als pharmakologische Modelle, da hier Probleme wie Pharmakokinetik und Spezifität eingesetzter Substanzen keine Rolle spielen. Aus diesem Grund werden die oben beschriebenen K<sub>Ca</sub>3.1<sup>-/-</sup> (Deletionsmutante), K<sub>Ca</sub>2.3<sup>T/T</sup> (Tetrazyklin-steuerbare KO) und K<sub>Ca</sub>3.1<sup>-/-</sup>/K<sub>Ca</sub>2.3<sup>T/T</sup> (doppeltransgene) Mausmodelle herangezogen und systematisch untersucht. Dabei soll die Retina als Standardmodell dienen, da man durch das sich erst postpartal entwickelnde Gefäßnetz einen hervorragenden Einblick in physiologische Vaskulo- und Angiogeneseprozesse im Verlauf hat (Uemura, Kusuhara et al. 2005)

Das erste Ziel dieser Arbeit soll sein, für das Retina-Modell der postnatalen Angiogenese K<sub>Ca</sub>-transgener Mäuse eine computergestützte Auswertung mit Hilfe des Programms Axio Vision (Version 4.7.2, Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und verschiedener Module (IntMess, AutMess, siehe 0) zur Quantifizierung und Retinavaskularisierung (Gefäßdichte, -durchmesser und Grad der Kapillarramifizierung) zu etablieren. Im Weiteren soll eine Vergleichsstudie zur postnatalen Retinavaskularisierung bei K<sub>Ca</sub>3.1<sup>-/-</sup> und K<sub>Ca</sub>2.3<sup>T/T</sup>-transgenen Tieren und K<sub>Ca</sub>3.1<sup>-/-</sup>/K<sub>Ca</sub>2.3<sup>T/T</sup>-doppeltransgenen Tieren erfolgen. Diese Untersuchung soll ergeben, ob durch eine genetische Defizienz endothelialer K<sub>Ca</sub>3.1 und K<sub>Ca</sub>2.3-Kanäle Angiogeneseprozesse verändert sind. Eine veränderte Reti-

navaskularisierung könnte hier auf eine wichtige Bedeutung dieser  $K_{Ca}$  Kanäle für Angiogenesprozesse im adulten Organismus hinweisen.

Es ergeben sich folgende spezifische Fragestellungen:

**1. Hat der spezifische KO des  $K_{Ca}3.1$ , des  $K_{Ca}2.3$  oder beider Kanäle eine Auswirkung auf die Angiogenese der Retina?**

Hierzu sollen die Gefäßdichte, die Verzweigungen sowie der Durchmesser in adulten (30 Tage) alten Tieren vergleichend ausgewertet werden. Zur Untersuchung werden folgende Mausmodelle herangezogen:

- $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -WT
- $K_{Ca}3.1^{-/-}$
- $K_{Ca}2.3^{T/T}$ +DOX
- $K_{Ca}3.1^{-/-}/K_{Ca}2.3^{T/T}$ +DOX

Die Retina der Mäuse soll präpariert und mittels Immunfluoreszenzfärbung gegen Kollagen IV das Gefäßnetz sichtbar gemacht werden. Anschließend sollen durch oben genannte Auswertekriterien quantitative Aussagen bezüglich der verschiedenen Genotypen getroffen werden. Veränderungen hierbei könnten erste Hinweise darauf geben, dass die untersuchten  $K_{Ca}$ -Kanäle eine Rolle bei der Gefäßentwicklung der Retina spielen und es generell zu morphologischen Auffälligkeiten in den Netzhautgefäßen adulter Tiere gibt.

**2. Unterscheiden sich die Gefäßsysteme in den Retinae verschiedener Entwicklungsstufen?**

Hierzu werden Gefäßsysteme von 5- und 7-Tage alten Mäusen untersucht. Es wird eine ähnliche Präparations- und Färbetechnik wie unter 1. verwendet, mit dem Unterschied, dass die Gefäßentwicklung der Retina zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen ist und man somit auch ein unterschiedliches Fortschreiten der Gefäße morphologisch erfassen kann.

Diese Untersuchungen sollen ergeben, ob sich etwaige Unterschiede der Gefäße im adulten Tier bereits während der Entwicklung manifestieren und inwiefern die stattfindenden physiologischen Umbauprozesse eventuell verändert sind.

**3. Kann die Überexpression von  $K_{Ca2.3}$  Veränderungen durch den KO von  $K_{Ca3.1}$  kompensieren?**

Hierfür wird die Doxyzyklin-Gabe bei den Mausmodellen  $K_{Ca2.3}^{T/T}$  und  $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T}$  ausgesetzt und die gleichen Untersuchungen und Auswertungen aus 1. wiederholt.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 CHEMIKALIEN UND GERÄTE

#### 2.1.1 CHEMIKALIEN (BEZUGSQUELLE)

- Antikörper:
  - o Alexa Fluor 488 Goat anti rabbit AK (Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
  - o Type IV Kollagen Rabbit anti mouse AK (Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Diethyläther (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Doxzyklin (Fa. Sigma, Steinheim, Deutschland)
- FCS (Fa. PAA, Cölbe, Deutschland)
- Methanol (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Millipor (Filteranlage, BMFZ, Marburg)
- NaOH (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- NGS (Fa. Sigma, Steinheim, Deutschland)
- PBS – Puffer (Fa. PAA, Cölbe, Deutschland)
- PCR-Zubehör:
  - o Agarose (Fa. PeqLab, Erlangen, Deutschland)
  - o DNA-Ledder 50 (Fa. PeqLab, Erlangen, Deutschland)
  - o dNTP (Fa. PeqLab, Erlangen, Deutschland)
  - o Ethidiumbromid (Fa. PeqLab, Erlangen, Deutschland)
  - o MgCl<sub>2</sub> (Fa. PeqLab, Erlangen, Deutschland)
  - o PCR-Primer (Fa. PeqLab, Erlangen, Deutschland)
  - o Reaktionspuffer (Fa. PeqLab, Erlangen, Deutschland)
  - o Taq-DNA-Polymerase (Fa. PeqLab, Erlangen, Deutschland)
- PFA (Fa. Sigma, Steinheim, Deutschland)

#### 2.1.2 GERÄTE UND MATERIALIEN (HERSTELLER)

- Corbit-Balsam (Fa. Hecht, Kiel, Deutschland)
- Deckgläser 24x50mm (Fa. Menzel, Braunschweig, Deutschland)
- Forschungsmikroskop (Axio Observer Z1, Fa. Zeiss, Oberkochen, Dtl.)

- Handschuhe Nobaglove Latex (Fa. Noba, Wetter, Deutschland)
- Kamera Power Shot G6 (Fa. Canon, Krefeld, Deutschland)
- Laborwaage BP 310 P (Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland)
- Lichtquelle KL 1500 (Fa. Leica, Solms, Deutschland)
- Objektträger Superfrost 76x26mm (Fa. Menzel, Braunschweig, Deutschland)
- PCR-Cups (Fa. Sarstedt, Nürnberg, Deutschland)
- Pipetten (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen (Fa. Sarstedt, Nürnberg, Deutschland)
- Präparationsbesteck
  - o Pinzette JFAL-3d (Fa. S&T, Heidelberg, Deutschland)
  - o Pinzette D-5aZ (Fa. S&T, Heidelberg, Deutschland)
  - o Pinzette 5 SF (Fa. S&T, Heidelberg, Deutschland)
  - o Schere OC 498R (Fa. Aesculap, Tuttlingen, Deutschland)
  - o Nadel Sterican 30 Gauge (Fa. Braun, Melsungen, Deutschland)
- Präparationsmikroskop (Stemi 2000 C, Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
- Thermocycler GeneAMP 2700 (Fa. Applied Biosystem, Carlsbad, USA)
- Vortex Genie 2 (Fa. Bender Hobein, Zürich, Schweiz)

## 2.2 TIERZUCHT, MEDIKAMENTENGABE, GENOTYPISIERUNG

### 2.2.1 TIERZUCHT

Die Tiere dieser Studie wurden in der Tierhaltung des Biomedizinischen Forschungszentrums der Philipps-Universität Marburg unter SPF (specific pathogen free) Bedingungen gezüchtet. Es wurden maximal sechs Tier gemeinsam in einem IVC (individual ventilated cage) System unter temperaturkontrollierten Bedingungen ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) mit einem 12 Stunden Tag-/Nacht-Zyklus gehalten. Sie erhielten Standardnagerfutter (0.25% Natrium, SNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser ad libitum. Spätestens 23 Tage post partum wurden die Jungtiere von ihrem Muttertier entwöhnt und nach Geschlecht getrennt, wobei Geburtstermin, Zuchtpaar und Genotyp auf einer Käfigkarte notiert wurden. Am Versuchstag wurden die Tiere aus der Tierhaltung des Biomedizinischen Forschungszentrums in die Laboratorien unserer Arbeitsgruppe

gebracht, mittels tiefer Ätherinhalationsnarkose getötet, das Körpergewicht bestimmt und die Augen gemäß unten beschriebener Technik verwertet.

### 2.2.2 DOXYZYKLIN-BEHANDLUNG

Um die in der Einleitung beschriebenen Probleme der Austreibung der Jungtiere aus dem Geburtskanal während der Geburt bei Überexpression des  $K_{Ca2.3}^{T/T}$  der  $K_{Ca2.3}^{T/T}$ -Tiere zu verhindern wurden bei diesen sowie den  $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T}$  doppeltransgenen Tieren prophylaktisch 4-6 Tage vor der Geburt dem Wasser Doxzyzyklin (2mg/ml in 2% Sucroselösung) beigemischt. Darunter konnten die beobachteten phänotypischen Auffälligkeiten (siehe 1.5.2) effektiv vermieden werden.

Diejenigen Versuchstiere, die sich ohne Doxzyzyklin unter Überexpression von  $K_{Ca2.3}$  entwickeln sollten bekamen nach der Geburt wieder normales Wasser. Die beiden Versuchsgruppen, bei denen die Auswirkung eines spezifischen Knockout des  $K_{Ca2.3}$  bzw. beider  $K_{Ca}$  untersucht werden sollten, wurden nach der Geburt mit dem Muttertier separiert und erhielten bis zum Versuchstag dem Wasser beigemishtes Doxzyzyklin (2mg/ml in 2% Sucroselösung).

### 2.2.3 GENOTYPISIERUNG

Um sicherzugehen, dass die Versuchstiere den erwünschten Phänotyp haben, wurden regelmäßig Polymerasekettenreaktionen (PCR) für  $K_{Ca3.1}$  und  $K_{Ca2.3}$  durchgeführt. Für den Nachweis des  $K_{Ca3.1}$ -Gens wurden folgende drei Primer verwendet:

**Kcnn4:** 5' – CTTTGGATCCAGATGTTTCTTGGTGTTAAG – 3'

**Exon4<sub>rev</sub>:** 5' – GCCACAGTGTGTCTGTGAGG – 3'

**Neo<sub>rev</sub>:** 5' – CGTGCAATCCATCCATCTTGTTCA – 3'

Der Kcnn4-forward-primer bindet an das vor dem Exon4 gelegenen Intron des Gens, während der Exon4<sub>rev</sub>-Primer spezifisch für Exon4 ist. Der Neo<sub>rev</sub>-Primer bindet an das in das Knockoutgen eingefügte Neomycin-Resistenzgen. Die erwarteten Längen der PCR-Produkte liegen bei 320 Basenpaaren (Bp) für das  $K_{Ca3.1}$ -Knockout-Gen und 160 Bp für das  $K_{Ca3.1}$ -Wildtyp-Gen.

Für den Nachweis des K<sub>Ca</sub>2.3-Gens wurden folgende 2 Primer verwendet:

**Glu F<sub>2</sub>:**        5' – ATGGACACTTCTGGGCACTT – 3'

**Glu R<sub>2</sub>**        5' – AGAGTGCAACAGACCAGGAT – 3'

Mit diesen Primern ergeben sich PCR-Produkte mit einer Länge von 312 Bp für das K<sub>Ca</sub>2.3 Wildtyp-Gen und 190 Bp für das verkürzte K<sub>Ca</sub>2.3<sup>T</sup> Gen.

Konnten bei einem Nachweis eines der beiden Kanalgene beide Genbruchstücke in Form von Banden nachgewiesen werden, wurden die jeweiligen Tiere als heterozygot eingestuft.

Für die PCR wurden 2,5 µl Zelllysate aus der Schwanzspitze der Tiere zu 22,5 µl der Reaktionslösung gegeben. Diese bestand aus 1x PCR Reaktionspuffer, 1,75 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 400 µmol/L dNTP, 0,4 µmol/L von jedem Primer und 1.25 U Taq Polymerase (alle Fa. PeqLab).

Die Reaktion wurde mit einem Thermocycler (GeneAMP2700, ABI System, USA) mit folgenden Temperaturschritten ausgeführt: Denaturierung (94°C für 3 min), 10 Zyklen (35 sek bei 94°C, 35 sek bei 58°C und 50 sek bei 72°C) gefolgt von 25 Zyklen (35 sec bei 94°C, 35 sec bei 58°C und 50 sec bei 72°C mit 5 sec Verlängerung in jedem Schritt) und einem abschließenden Extensions-Schritt (10 min bei 72°C). Die Reaktionsprodukte wurden in einem 1%igen Agarose-Gel mittels Elektrophorese aufgetrennt und die Größe mit Hilfe eines Größenstandards (DNA-Sizer 100 Bp, Fa. PeqLab) bestimmt. Als Negativkontrolle wurde bei jedem PCR-Experiment ein Leerwert, d.h. nur Reaktionsgemisch ohne Zusatz von DNA, bestimmt.

## 2.3 PRÄPARATHERSTELLUNG

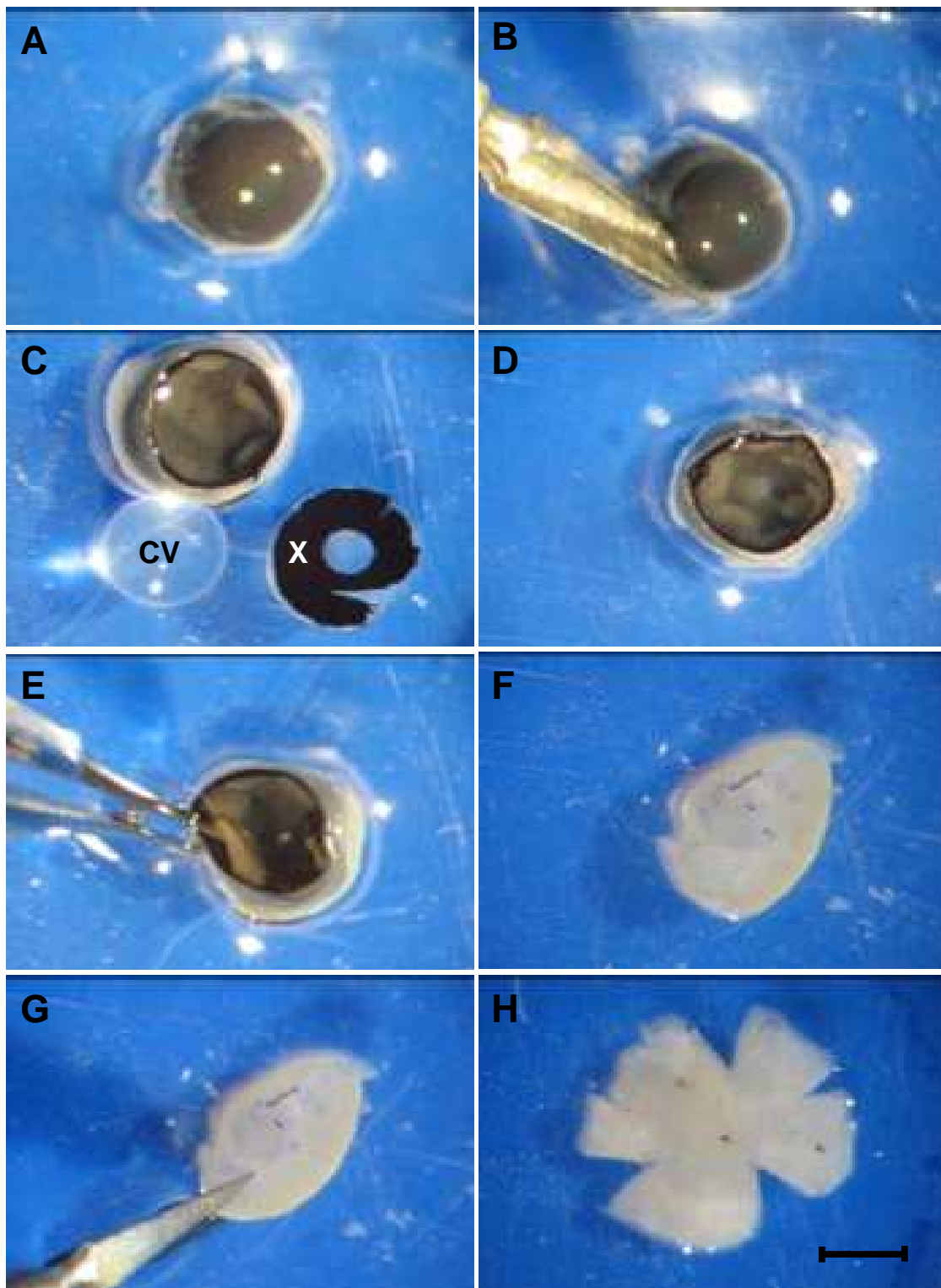
### 2.3.1 RETINAPRÄPARATION

Die Präparationsarbeiten an den Bulbi oculi wurden mit einem Präparationsmikroskop (Stemi2000C, Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei vierfacher Vergrößerung durchgeführt und die Bilder der Arbeitsschritte mit einer Canon Power Shot G6 (Fa. Canon, Krefeld, Deutschland) fotografiert (**Abb. 2-1**).

Das Ziel sollte es sein, aus dem kompletten Bulbus die globuläre Retina zu isolieren und intakt in eine zweidimensionale Form zu bringen. Zu diesem Zweck wurden die Tiere am Versuchstag aus der Tierhaltung des Biomedizinischen Forschungszentrums in die



Laboratorien gebracht. Die Mäuse wurden mittels tiefer Ätherinhalationsnarkose getötet, das Körpergewicht bestimmt und notiert. Nun wurden beide bulbi oculi durch leichten Druck auf die tarsi oculi nach außen gedrückt und vorsichtig mit einer kleinen Schere die äußere Augenmuskulatur und der Nervus opticus durchtrennt. Die so vollständig abgetrennten, unversehrten Bulbi wurden entnommen, in 4 prozentige PFA (Paraformaldehyd)-Lösung eingebracht und für 45 – 60 min bei 4°C fixiert. Nach dieser Zeit wurden beide Augen in PBS (Phosphate Buffered Saline)-Lösung unter ein Stereomikroskop gebracht und alle folgenden Arbeiten unter 3,2 - 4-facher Vergrößerung durchgeführt. Es folgten eine Stichinzision mit einer 30-Gauge Einmalspritze in die Cornea auf Höhe der Ora Serrata, daraufhin wurde mit Hilfe einer Mikroschere eine Zirkumzision noch innerhalb der Cornea durchgeführt. Diese wurde abgehoben und das zum Vorschein kommende Corpus vitreum mit einer Pinzette vorsichtig entfernt. Anschließend wurde mit einer stumpfen Pinzette die Retina an der Ora Serrata vom Pigmentepithel getrennt und vorsichtig aus Choroidea und Sklera herausgeschält, wodurch man die Retina in toto in nach wie vor kugeliger Gestalt erhielt. Nun wurde die Retina an allen vier Seiten senkrecht eingeschnitten und vorsichtig nach außen gebogen, wodurch man die Form eines vierblättrigen Kleeblattes erhielt (**Abb. 2-1**). Die so präparierten Retinae wurden für 10 min bei 4°C in Methanol gehärtet.



**Abb. 2-1: Schritte der Präparatherstellung;** **A:** Der Bulbus oculi wurde am N. opticus abgeschnitten und die äußeren Augenmuskeln entfernt; **B:** Nach Stichinzision wird mit einer feinen Schere eine Zirkumzision auf Höhe der Ora Serrata durchgeführt; **C:** Cornea, Iris (X) und Corpus vitreum (CV) sind vom leeren Bulbus separiert; **D:** Bulbus oculi ohne CV, im Hintergrund ist die weiße Retina zu sehen; **E:** Mit einer feinen Pinzette wird die Retina aus der Choroidea geschält; **F:** Separierte, kugelförmige Retina; **G:** Es werden vier radiäre Schnitte in die Retina eingefügt; **H:** Kleeblattform der nun flachen Retina; 4-fache Vergrößerung; Maßstabsbalken= 2mm

**Besonderheiten bei der Präparation fünf und sieben Tage alter Tiere:**

Bei den sehr jungen Tieren waren die Tarsi noch nicht fertig ausgebildet und bildeten eine geschlossene Hautschicht über den Augen. Um dennoch die Präparation zu ermöglichen, war es nötig, zuerst die Haut über den Augen der bereits toten Tiere großzügig mit einer kleinen Schere zu resezieren. Daraufhin konnte man wie oben beschrieben mit der Enukleation fortfahren.

Durch die viel kleineren Augen gestaltete sich die Präparation insgesamt deutlich schwieriger als bei den adulten Tieren, auch da die Cornea nur etwa 1/5 des Bulbus ausmachte und nicht wie bei vollständig entwickelten Augen ca. 1/3. Eine weitere Besonderheit kam bei der Präparation und der Auswertung zum tragen - vom centrum retinæ zogen noch die embryonalen Reste der A. hyaloidea bis an den Rand der pars optica der Retina. Diese Reste enthielten ebenfalls Kollagen IV und wurden durch ihre oberflächliche, freie Lage sehr stark angefärbt, wodurch die eigentlich relevanten Gefäßstrukturen im fertigen Präparat teilweise überdeckt wurden. Um das zu verhindern wurde versucht, die Überreste der A. hyaloidea bei der Präparation mit Hilfe einer feinen spitzen Pinzette zu entfernen ohne dabei die Retina selbst zu beschädigen. Diese Art der Präparation gestaltete sich schwierig, sodass - zusammen mit oben genannten Gründen - die Qualität der angefertigten Präparate nicht immer optimal für eine Auswertung war.

**2.3.2 GEFÄßANFÄRBUNG**

Für die Visualisierung des Kapillarnetzes wurde auf eine leicht modifizierte Technik von Wang zurückgegriffen (Wang, Wu et al. 2003). Die nach dem Methanolbad deutlich steiferen Retinae wurden mit einer feinen Pinzette in eine kleine Petrischale mit 2 ml Puffer mit Blocker-Zusatz, bestehend aus 1,0 ml (50%) FCS (fetal calf serum, fetalem Kälberserum), 0,6 ml (30%) PBS (phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung) und 0,4 (20%) NGS (normal goat serum, normales Ziegenserum), eingebracht und 2h bei 4°C inkubiert. In der Folge wurden die Netzhäute in eine weitere Petrischale mit 2 ml Lösung umgesetzt, die aus 1,2 ml (60%) PBS, 0,4 ml (20%) FCS und 0,4 ml (20%) NGS bestand und 4 µl (Verdünnung 1:500) Kaninchen anti Maus (Rabbit anti Mouse) Typ IV Kollagen Antikörper enthielt. In dieser Lösung verblieben die Präparate über Nacht (mindestens 12 Stunden).

Am nächsten Tag wurden die überschüssigen, nicht gebundenen Antikörper in drei Waschgängen von jeweils 20 min in PBS entfernt und es folgte eine zweistündige Inkubation bei 4°C mit dem sekundären Antikörper, der mit AF (Alexa Fluor) 488 gekoppelt war, in folgender Lösung: 1,2 ml (60%) PBS, 0,4 ml (20%) FCS und 0,4 ml (20%) NGS versetzt mit 4 µl (Verdünnung 1:500) Ziegen anti Kaninchen (goat anti rabbit) Alexa Fluor Antikörper. Ab diesem Schritt wurden die Petrischalen mit lichtundurchlässiger Folie umwickelt um einem Ausbleichen der Präparate vorzubeugen.

Nach Ablauf der zwei Stunden folgten drei weitere 20-minütige Waschgänge in PBS, um erneut überschüssige, nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Zur weiteren Präparatherstellung wurden die Retinae auf einen bereits beschrifteten Objektträger aufgebracht und sehr vorsichtig unter dem Präparationsmikroskop (Stemi 2000 C, Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland) auf die volle Fläche ausgebreitet, sodass das fertige Präparat die typische Kleeblattform aufwies. Auf die nun fertigen Retinae wurde Corbit-Balsam (Fa. Hecht, Kiel Deutschland) aufgeträufelt und mit einem Deckglas fixiert. Bei dieser Prozedur durfte man nur wenig Kraft aufwenden, da sonst das verhältnismäßig dicke Präparat zerdrückt werden konnte. Das Corbit sollte mindestens 24 h aushärten, bevor man die Präparate unter dem Mikroskop betrachten konnte.

Da Kollagen IV ein Hauptbestandteil der Basalmembranen von Endothelzellen ist, ließen sich durch diese immunhistochemische Anfärbung zuverlässig auch sehr kleine Blutgefäße darstellen.

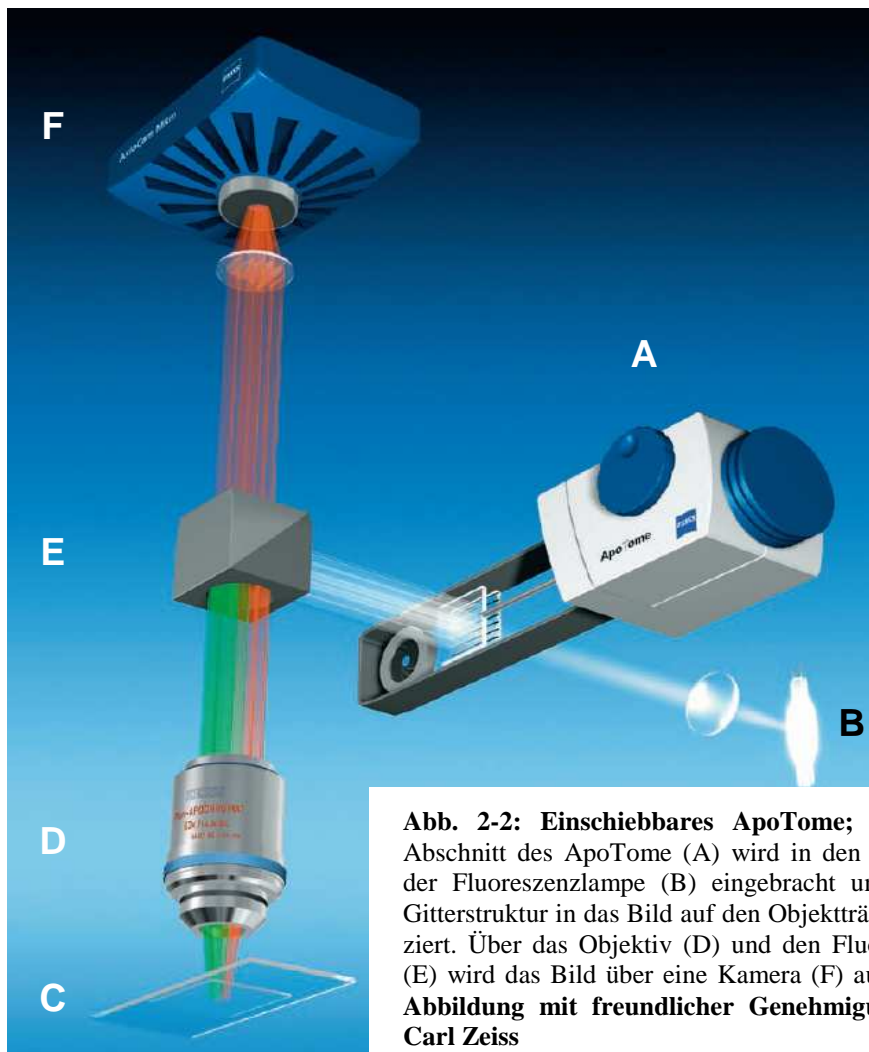
## **2.4 MIKROSKOPIE**

Die mikroskopischen Arbeiten wurden an einem inversen Forschungsmikroskop der Firma Carl Zeiss (Axio Observer Z1, Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Zentrale Module dieses Mikroskops für die angefertigte Arbeit waren:

- Eine Selbstjustierende Fluoreszenz-Metallhalogenidlampe zur homogenen Sehfeldausschleuchtung (HBO-Lampe, Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
- Filtersatz Alexa Fluor 488 (Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
- Objektiv EC Plan Neofluar 10x/0,30 M27 (Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland)

- Monochrome Digitalkamera speziell für Fluoreszenzfärbungen abgestimmt, 12-bit Graustufenumfang und stufenlose Belichtungszeiteinstellung (AxioCam MRm, Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
- ApoTome (Beschreibung siehe unten)

Ein wichtiges Instrument zur Herstellung brauchbarer Bilder in dieser Arbeit stellte das ApoTome dar (**Abb. 2-2**). Dabei handelt es sich um eine Einschubvorrichtung in den Fluoreszenzstrahlengang in der Ebene der Blende. In komplett eingeschobenem Zustand werden zwei Glasplatten in den Strahlengang eingebracht. Auf die erste ist eine Gitterstruktur aufgedampft, die über das Anregungslicht auf das zu mikroskopierende Objekt projiziert wird, die zweite planparallele Glasplatte ist mit einem Kippmechanismus versehen, der über die Kippbewegung die Projektion des Gitters durch optische Ablenkung in der Präparatebene hin- und herbewegen kann. Durch die Gitterprojektion wird nach vorheriger Gitternetzfokusierung eine definierte Gitterkonstante in die Fokusebene des Objektivs projiziert und in drei definierten, gleich großen Schritten lateral in der Probe bewegt. An jeder der drei Positionen wird ein Rohbild mit einer vollautomatisch angesteuerten Kamera gemacht. Da das Gitter nur in einer sehr begrenzten Z-Ausdehnung - dem Tiefenschärfebereich des verwendeten Objektivs - scharf abgebildet wird, verschwindet das Gitter unter- und oberhalb dieses Bereichs aus dem Fokus. Die Software kann anhand eines Algorithmus, der die Homogenität der ankommenden Grauwerte detektiert erkennen, ob die ankommenden Bildinformationen vollständig (kein Gitter in der Fokusebene - unerwünschter Bildanteil) oder unvollständig (Gitter in der Fokusebene - erwünschter Bildanteil) sind. Aus den drei Rohbildern werden nun die "Out-of-Focus" Bildanteile entfernt und die übrigen (unvollständigen) Bildanteile zu einem Ergebnisbild verrechnet, dass sehr selektiv nur die Fokusebene des Objektivs darstellt. Somit wird ein optischer Schnitt durch ein dickes Präparat gelegt und kann isoliert, ohne störendes Hintergrundrauschen, betrachtet werden. Da es sich um eine mechanisch-optische Verrechnung handelt, ist diese Methode, was die Dicke der darstellbaren Schichten angeht, modernen LSM (Laser-scanning-Mikroskopen) unterlegen, für die in dieser Arbeit untersuchten Präparate jedoch ausreichend.



**Abb. 2-2: Einschiebbares ApoTome;** Der vordere Abschnitt des ApoTome (A) wird in den Strahlengang der Fluoreszenzlampe (B) eingebracht und somit die Gitterstruktur in das Bild auf den Objektträger (C) projiziert. Über das Objektiv (D) und den Fluoreszenzfilter (E) wird das Bild über eine Kamera (F) aufgenommen. **Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Fa. Carl Zeiss**

### 2.4.1 SOFTWARE

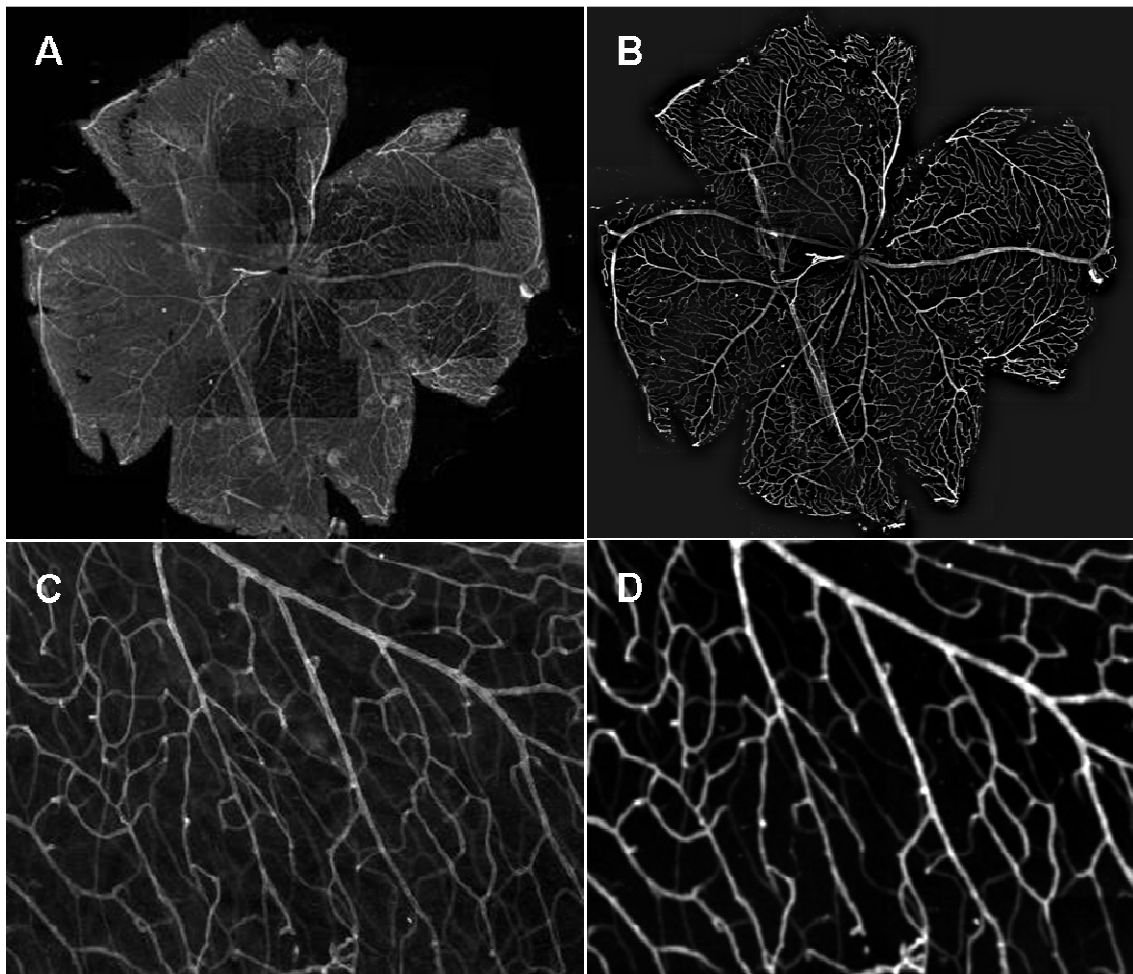
Zur Bildaufnahme und weiteren Verarbeitung wurde eine speziell für das Forschungsmikroskop entwickelte Software (AxioVision – Version 4.7.2, Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet, die über eine Workstation (Fujitsu Siemens CELSIUS V Serie) direkt an das Mikroskop angeschlossen ist. Darüber konnten Mikroskopsteuerung, Belichtungszeit, Kamera, Objektive, Filtersätze, Fluoreszenzlampe und vieles mehr direkt vom Computer aus angesteuert werden. Neben diesen Grundfunktionen kann die Software über ein Modulsystem anwenderspezifisch erweitert werden. Folgende Zusatzmodule wurden bei dieser Arbeit verwendet:

- Panorama – ein Programm zur automatischen (über Stitching-Algorithmus), pixelgenauen Zusammensetzung manuell aufgenommener 2D-Einzelbilder mit dem Ziel große Übersichtsbilder aus vielen Einzelbildern zu erzeugen.

- IntMess – zur Messung verschiedener Messparameter wie Fläche, Durchmesser, Winkel, Gaußwertstatistiken (Mittelwerte, Standardabweichungen) und der Exportmöglichkeit in Tabellenkalkulationsprogrammen.
- AutMess – hiermit lassen sich automatische Messroutinen erstellen, die standardisiert auf ähnliche Bilder angewendet werden können und eine hohe Reproduzierbarkeit und somit interne Objektivität und Reliabilität gewährleisten.

## 2.5 AUSWERTUNG

Zur Visualisierung der mit Alexa Fluor angefärbten Retinae wurde ein Axio Observer Z1 Fluoreszenzmikroskop (Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet. Die Präparate zeigten unter Fluoreszenzlicht mit einem Alexa Fluor 488 Filter eine homogene Gefäßanfärbung über das ganze Präparat hinweg. Bei 100facher Vergrößerung konnte man in der Z-Achse durch die verhältnismäßig dicken Präparate durchfokussieren und so die verschiedenen Gefäßplexus differenzieren – ein oberflächliches Hauptgefäßsystem mit Arterien und Venen auf der Innenseite der Retina, sowie zwei sekundäre, tiefer gelegene Kapillarnetze, die sich über- und unterhalb der inneren Körnerzellschicht befinden (siehe Einleitung). Um eine Auswertung möglich und sinnvoll zu gestalten, war es nötig, das aufgrund der Dicke des Präparates recht intensive Hintergrundrauschen zu unterdrücken. Aus diesem Grund wurde das bereits beschriebene ApoTome in den Strahlengang eingebracht und auf das oberflächliche Gefäßnetz fokussiert. Die Einzelbilder wurden mit  $6 \pm 2$  s Belichtungszeit aufgenommen und mit dem Programm Panorama zu einem Gesamtbild zusammengesetzt. Um eine komplette Retina zu erhalten bedurfte es ca. 50-70 Kachel- oder Einzelbilder, je nachdem wie groß die Überlappungen der Einzelbilder gewählt wurden. Für eine bessere Bildqualität und einfachere Handhabung wurden diese Kachelbilder zu einem einzigen Bild konvertiert und anschließend mit einer shading-Korrektur bearbeitet. Gegenüber der Aufnahme ohne ApoTome zeigte sich eine deutlich kontrastreichere Darstellung des oberflächlichen Gefäßplexus (**Abb. 2-4**), wodurch dieser eindeutig auszuwerten war. Welche Arten der Auswertung in dieser Arbeit verwendet wurden, wird im Folgenden besprochen.



**Abb. 2-4: Präparate mit und ohne Benutzung des ApoTome;** **A:** Gesamte Retina ohne ApoTome aufgenommen, deutliches Hintergrundrauschen wegen der Dicke des Präparates; **B:** Gleiche Retina mit ApoTome, das Gefäßnetz ist deutlich klarer zu erkennen, das Hintergrundrauschen ist herausgefiltert; **C:** Bildausschnitt aus A, deutlich sind auch die tiefer gelegenen Plexus zu erkennen; **D:** Bildausschnitt aus B, die tiefer gelegenen Plexus sind außerhalb der Fokusebene des ApoTome und werden herausgerechnet; Aufgenommen mit 100facher Vergrößerung;

### 2.5.1 FLÄCHENANALYSE

Eine Art der Auswertung stellte die Flächenanalyse mit dem Modul AutMess dar. Bei diesem Modul wurde ein automatischer Ablauf programmiert, der für beliebig viele Präparate wiederholbar war und somit eine, da weitgehend benutzerunabhängig, hohe Reliabilität und Objektivität gewährleistete. Das Gesamtbild wurde in Grauwerte umgerechnet, wobei Abschnitte mit einer Anfärbung, optimalerweise das Gefäßnetz, deutlich höhere Grauwerte besaßen als der Hintergrund. Als nächster Schritt wurden manuell ein oberer und ein unterer Grauwert festgelegt, dessen Werte die Grenzwerte (Threshold) bildeten, zwischen denen ein Objekt erkannt wurde. Speziell der untere Wert war sehr

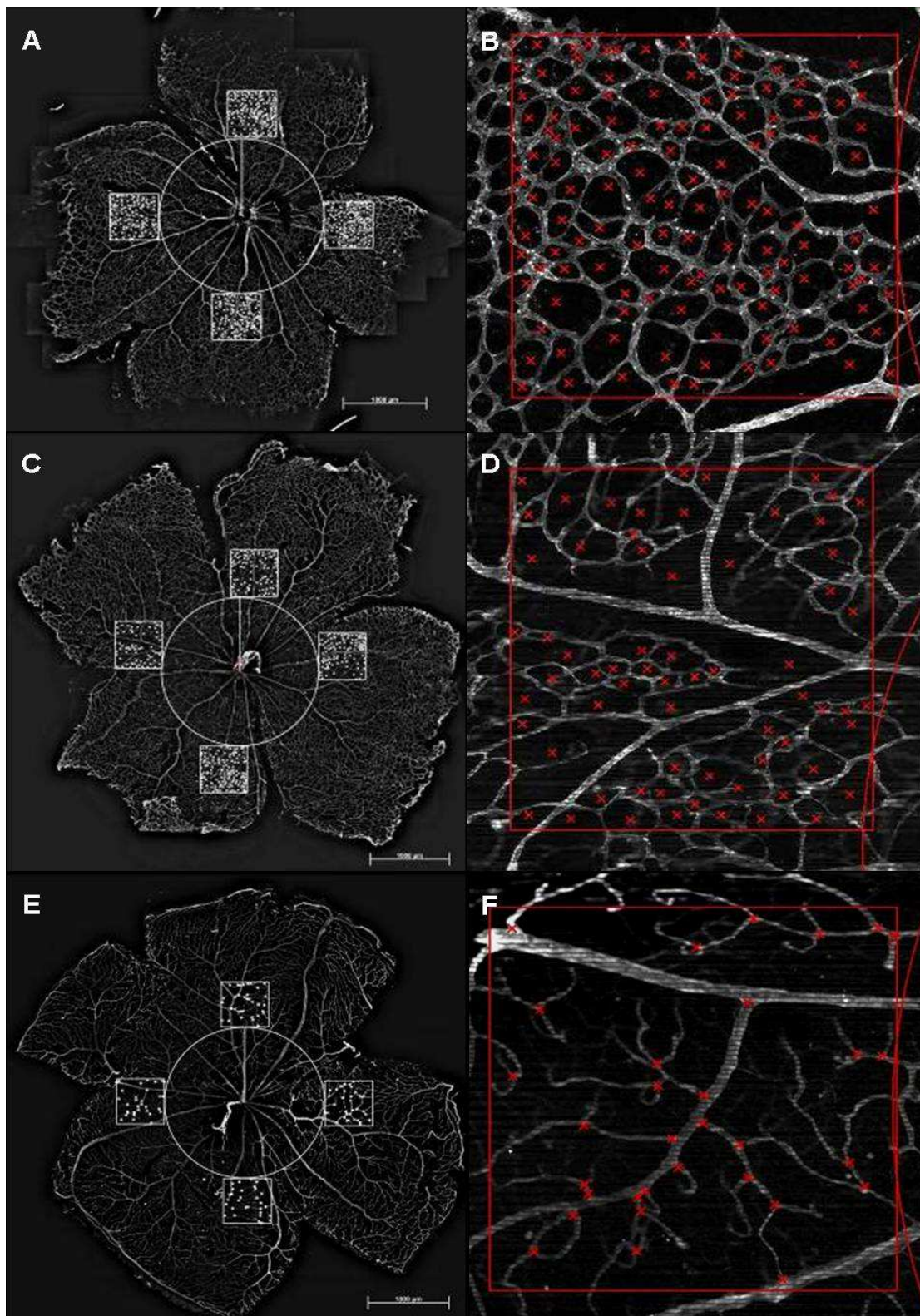


gut dazu geeignet, dass das trotz Apotome noch vorhandene Hintergrundrauschen nicht mit in die Auswertung einfließt. Ein weiterer Schritt, der manuell ausgeführt werden musste, war das Legen eines Rahmens, der die Ränder der Retina simuliert. Da die Retinae unterschiedliche Größen aufwiesen und präparationsbedingt nicht immer vollständig vorlagen, war das ein wichtiger Schritt um die Ergebnisse untereinander vergleichbarer zu machen. Das Programm erkannte nun alle Objekte, die innerhalb der Grauwertgrenzen und innerhalb des gelegten Rahmens lagen, als Gefäße. Die Gesamtfläche der Gefäße wurde in einem abschließenden Schritt durch die Gesamtfläche geteilt, und in Prozent ausgegeben. Man erhielt also einen Prozentwert, der angab, wie groß der mit Gefäßen bedeckte Retinaanteil war (vgl. Kasai, Shintani et al. 2008).

### 2.5.2 ANALYSE DER VERZWEIGUNGEN

Bei dieser Art der Auswertung wurde in das Gesamtbild der Retina ein Kreis mit dem Eintritt der A. centralis retinae als Mittelpunkt und einem Radius von 1000  $\mu\text{m}$  mit der Software IntMess hineingelegt. Anschließend wurden in jedem der vier Quadranten der Retina ein Quadrat definierter Größe (468 x 468 Pixel, entspricht bei 1,29  $\mu\text{m}/\text{Pixel}$  einer Kantenlänge von 603,72  $\mu\text{m}$ ) eingefügt, wobei eine Seite dieses Quadrates Kontakt zu dem vorliegenden Kreis hatte. Innerhalb dieser Quadrate wurde jede Abzweigung eines Gefäßes (branch) markiert und anschließend von der Software ausgezählt. Dabei war der Mittelwert der Verzweigungen aus allen 4 Quadranten der jeweilige Wert für die Retina, bei der die Auswertung durchgeführt wurde (vgl. Hellstrom, Phng et al. 2007).

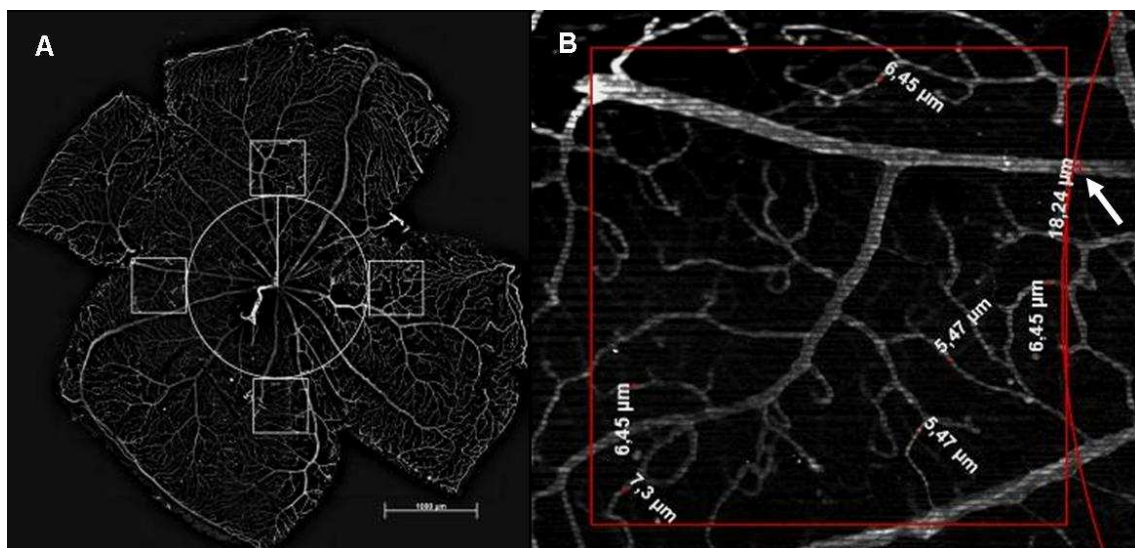
Bei den fünf und sieben Tage alten Tieren wurden die Quadrate auf dieselbe Art in die Retina projiziert, allerdings wurde die Auszählung etwas anders vorgenommen. Aufgrund der deutlich größeren Anzahl von Abzweigungen bei den sehr jungen Tieren wurden stattdessen die Anzahl der von Gefäßen umgebenen Areale markiert und anschließend durch die Software ausgezählt. Auch dadurch erhielt man eine quantitative Aussage über die Ausprägung der Verzweigungen, da eine höhere Anzahl von Verzweigungen direkt mit der Anzahl der Areale korrelierte (**Abb. 2-5**).



**Abb. 2-5: Analyse der Verzweigungen bei unterschiedlichen Altersstufen;** linke Spalte: gesamte Retina, rechte Spalte: Ausschnitt der ausgezählten Quadrate; **A+B:** 5-Tage alte Retina, das Gefäßnetz ist noch nicht bis an den Rand der Retina gewachsen, stark verzweigter Gefäßplexus; **C+D:** 7-Tage alte Retina, der Rand der Retina ist mit Gefäßen bedeckt, die tiefen Plexus sind noch nicht ausgebildet; **E+F:** Adulte Retina, Alle Plexus sind voll ausgebildet, die Verzweigungen sind markiert; Aufgenommen mit 100facher Vergrößerung; Maßstabsbalken= 1000  $\mu\text{m}$

### 2.5.3 ANALYSE DER DURCHMESSER

Eine letzte Art der Auswertung betraf die Durchmesser der Gefäße. Bei dieser Methode wurde erneut auf den eingezogenen Kreis und die in Kontakt dazu stehenden Quadrate in allen 4 Quadranten aus 2.5.2 zurückgegriffen. Es wurden in jedem Quadrat willkürlich sechs Endkapillaren gewählt und mit dem Modul IntMess der Durchmesser vermessen. Zusätzlich wurden auch die Hauptäste der A. centralis retina auf Höhe des Kreisumfangs ausgemessen, um sowohl einen Vergleich für die kleinsten Gefäße, die Kapillaren, als auch für die großen Gefäße zu haben. Somit bekam man pro Retina die Durchmesser von 24 Kapillaren und 3-6 Hauptästen. Die Arterien waren in den Präparaten daran zu erkennen, dass sie auf der gesamten Länge relativ dicke Abzweigungen aufwiesen, während die Venen insgesamt dicker waren, jedoch in ihrem Verlauf vom Rand der Retina aus nur kleine Zuflüsse bis zu ihrem Zusammentreffen im Centrum retinae erhielten. Die statistischen Grundlagen der Auswertung werden im nächsten Abschnitt beschrieben.



**Abb. 2-6: Analyse der Durchmesser; A:** Gesamte Retina; **B:** Ausschnitt mit markierten Endkapillaren und Arterie (Pfeil); Aufgenommen mit 100facher Vergrößerung; Maßstabsbalken= 1000 µm

## 2.6 STATISTISCHE ANALYSEN

Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM (Standardfehler des Mittelwertes) angegeben. Die einzelnen Gruppen und Subgruppen wurden durch Anwendung des Students-T-Tests verglichen. Als Nullhypothese  $H_0$  galt die Annahme, dass sich die Gefäßentwick-

lung sowohl bei den Wildtyp-Tieren als auch bei den transgenen Mäusen nicht unterschied. Diese galt als widerlegt, wenn die errechneten P-Werte signifikant von der Nullhypothese abwichen. Gemäß der allgemein anerkannten wissenschaftlichen Vorgehensweise wurden P-Werte  $< 0,05$  als signifikant erachtet und mit einem Stern (\*) markiert, P-Werte  $< 0,01$  wurden mit einem doppelstern (\*\*) visualisiert.

Aufgrund der Testung von drei Variablen (Fläche, Gefäßdurchmesser, Verzweigungen) wäre eine Adjustierung für multiples Testen gerechtfertigt gewesen. Da jedoch nicht davon auszugehen war, dass die drei Variablen unabhängig voneinander waren, hätte eine klassische, sehr konservative Bonferroni-Korrektur, zu einer starken Unterschätzung des Ergebnisses geführt, die der Fragestellung nicht gerecht geworden wäre. In der Auswertung wurden daher die Grafiken ohne Adjustierung aufgestellt, bei Erreichen von Signifikanzschwellen wurden die P-Werte mit und ohne potentieller Bonferroni-Korrektur in folgender Form angegeben: P-Wert X,XXX adjustiert X,XXX.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 TIERZUCHT, MEDIKAMENTENGABE UND GENOTYPISIERUNG

##### 3.1.1 TIERZUCHT

Wichtig für die Durchführung der Versuche dieser Arbeit war es, die vorhandenen transgenen Mausmodelle als homozygote Linien fortzuführen. Zu diesem Zweck wurden Zuchtpaare aus homozygoten  $K_{Ca2.3}^{T/T}$ -Tieren,  $K_{Ca3.1}^{-/-}$ -Tieren sowie  $K_{Ca2.3}^{T/T}/K_{Ca3.1}^{-/-}$ -Tieren gebildet und in der geschlossenen Tierhaltung des Biomedizinischen Forschungszentrums der Philipps-Universität-Marburg gehalten. Die Elterntiere zeigten während der Zucht keine Auffälligkeiten und waren in der Lage, gesunde Nachkommen zu zeugen. Um den Genotyp zu bestätigen wurden PCR-Untersuchungen wie unter 2.2.3 beschrieben durchgeführt, die Ergebnisse sind weiter unten aufgeführt.

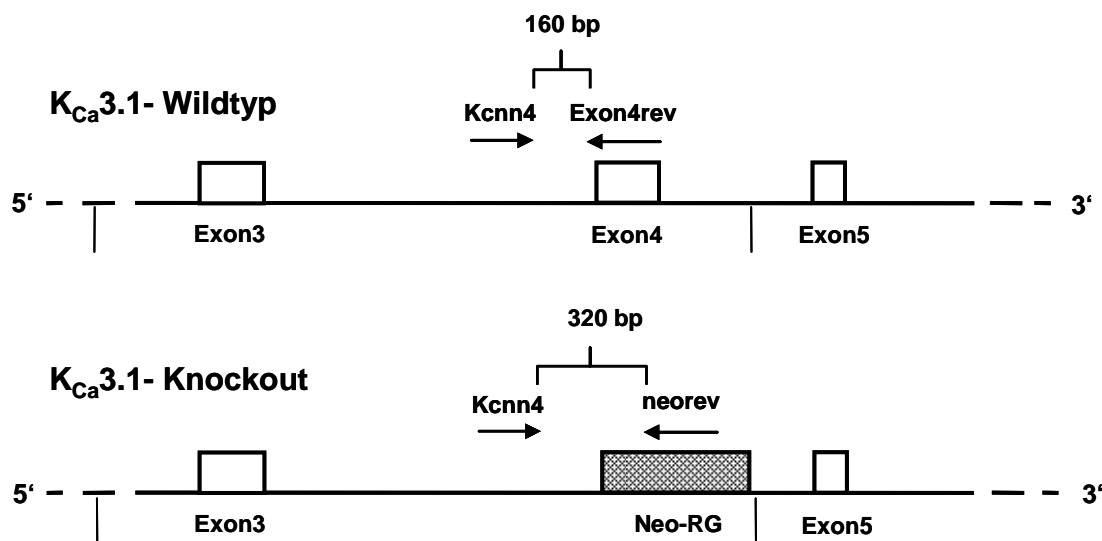
##### 3.1.2 DOXYZYKLIN-BEHANDLUNG

Um die in der Einleitung beschriebenen Probleme während der Austreibungsphase der Geburt zu verhindern, erhielten die Muttertiere prophylaktisch 4-6 Tage vor der Geburt Doxyzyklin (2mg/ml in 2% Sucroslösung) in das Trinkwasser beigemischt. Es zeigten sich unter der Gabe keine Verhaltensauffälligkeiten und die Geburtsprobleme wurden effektiv verhindert.

Zur Beurteilung der Gefäßentwicklung bei einem Knockout des  $K_{Ca2.3}$ -Kanals ist es nötig, die für das Gen  $K_{Ca2.3}^T$  homozygoten Versuchstiere bis zu ihrer Verwendung auf DOX zu belassen. Zu diesem Zweck wurden die Jungtiere zusammen mit dem Muttertier nach der Geburt vom Vatertier separiert und es wurde weiterhin Doxyzyklin dem Trinkwasser beigemischt. Nach spätestens 23 Tagen wurden sie von der Mutter entwöhnt und nach Geschlecht getrennt. Das Muttertier wurde ohne DOX zurück in den Zuchtkäfig gesetzt, die weiblichen Nachkommen ebenfalls ohne DOX abgesetzt. Die männlichen Nachkommen wurden bis zu ihrer Verwendung auf DOX belassen, um eine permanente Suppression der  $K_{Ca2.3}$ -Kanal-Expression zu gewährleisten.

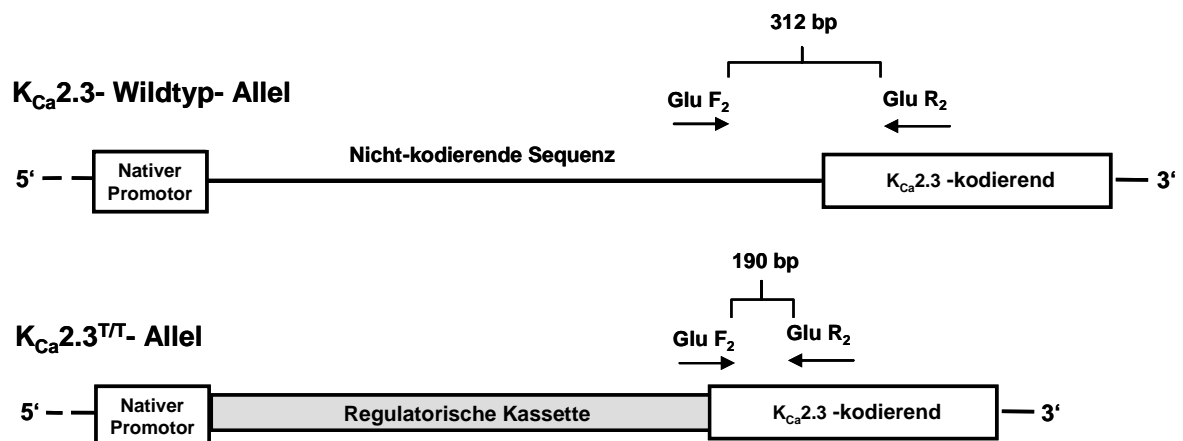
### 3.1.3 GENOTYPISIERUNG

Die Genotypisierung für das  $K_{Ca}3.1$ -Gen wurde mit den Primern  $Exon4_{rev}$ ,  $Kcnn4$  und  $Neo_{rev}$  (Sequenzen siehe 2.2.3) ausgeführt (**Abb. 3-3**). Bei dem Knockout-Gen ist das Exon4 des nativen  $K_{Ca}3.1$ -Gens durch das Neomycin-Resistenzgen ersetzt. Der  $Kcnn4$ -Primer lagert sich an das vor dem Exon4 gelegene Intron an, der  $Exon4_{rev}$ -Primer ist spezifisch für das Exon4 und der  $Neo_{rev}$ -Primer bindet an das Neomycin-Resistenzgen (**Abb. 3-1**).



**Abb. 3-1: Schematische Darstellung der Bindung spezifischer Primer für das  $K_{Ca}3.1$ -Gen;** Bei der  $K_{Ca}3.1$ -Deletionsmutante wurde das Exon4 durch ein Neomycin Resistenzgen ersetzt. Für die PCR werden Primer verwendet, die entweder an das Exon oder das Resistenzgen spezifisch binden, somit kommt es zu den verschiedenen langen Bruchstücken.

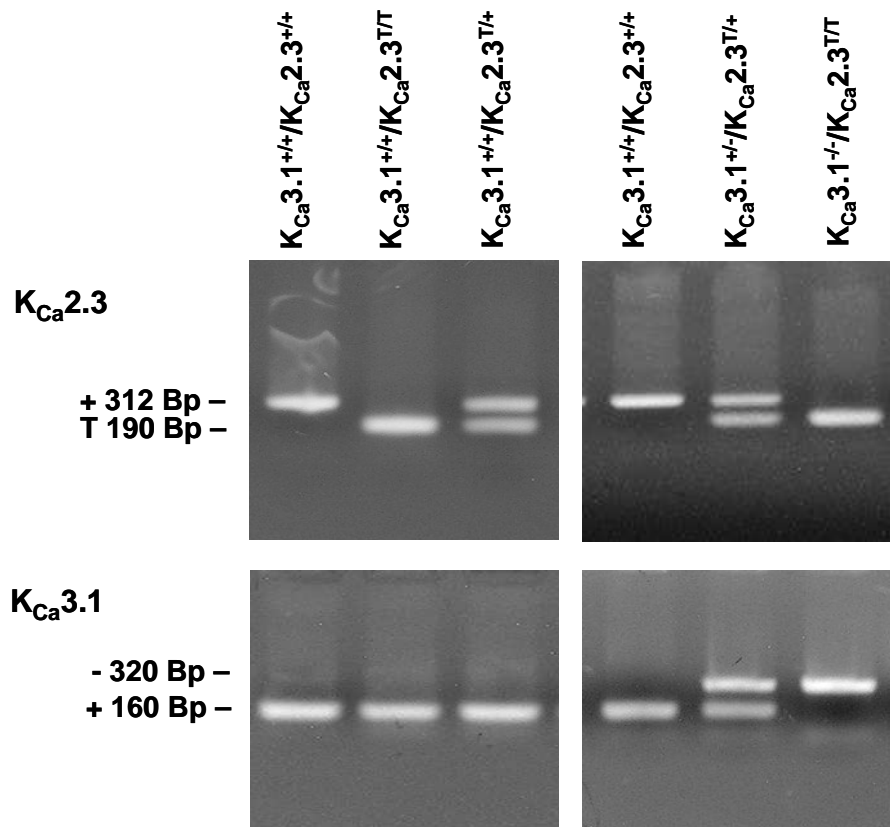
Für die Detektierung des  $K_{Ca}2.3^T$ -Gen wurden die zwei Primer  $GluForward2$  und  $GluReverse2$  (Sequenzen siehe 2.2.3) verwendet (**Abb. 3-2**). Die regulatorische Kassetten, die in das  $K_{Ca}2.3$ -Wildtypgen eingesetzt wurde, führte zur Verkürzung einer Polyglutaminsequenz um 40 Kodons. Die Multiplex-PCR ergab somit ein Produkt von 312 Bp bei homozygoten Wildtyptieren ( $K_{Ca}2.3^{+/+}$ ) und ein Produkt von 190 Bp bei Tieren, die homozygot für das  $K_{Ca}2.3^T$ -Gen waren ( $K_{Ca}2.3^{T/T}$ ). Bei heterozygotem Genotyp zur Kontrolle zeigte sich sowohl eine Bande bei 312 Bp, als auch eine Bande bei 190 Bp, analog zu den beiden Banden des  $K_{Ca}3.1$ -Gens (**Abb. 3-3**).



**Abb. 3-2: Schematische Darstellung der Bindung spezifischer Primer für das  $K_{Ca}2.3^T$ -Gen;** Durch das Einfügen der regulatorischen Kassette kommt es zu einem Verlust von 40 Kodons, wodurch die spezifisch bindenden Primer enger aneinander liegen. Somit liegen auch hier Bruchstücke unterschiedlicher Länge vor.

Die Homozygotität konnte so stichprobenartig für alle in dieser Arbeit verwendeten Tiere nachgewiesen werden, so dass eine wichtige Voraussetzung für die Untersuchung der Auswirkungen des Knockout der Kanäle  $K_{Ca}3.1$ ,  $K_{Ca}2.3$  oder beider Kanäle gegeben war, nämlich die reproduzierbare und homogene Beeinflussung der Kanalexpression auf genetischer Ebene.





**Abb. 3-3: Exemplarische Darstellung einer Multiplex PCR;** Gelelektrophorese-Produkte zur Genotypisierung der Versuchstiere. Die obere Beschriftung bezeichnet die Genotypen der untersuchten Tiere. Mit + ist jeweils die Bande des Wildtypgen bezeichnet, mit – das  $KCa3.1$ -Knockoutgen und mit T das veränderte  $KCa2.3$ -Gen. Zeigt sich nur eine Bande sind die Tiere homozygot, bei zwei Banden sind die Tiere heterozygot für den jeweiligen Kanal.

## 3.2 PRÄPARATHERSTELLUNG

### 3.2.1 RETINAPRÄPARATION

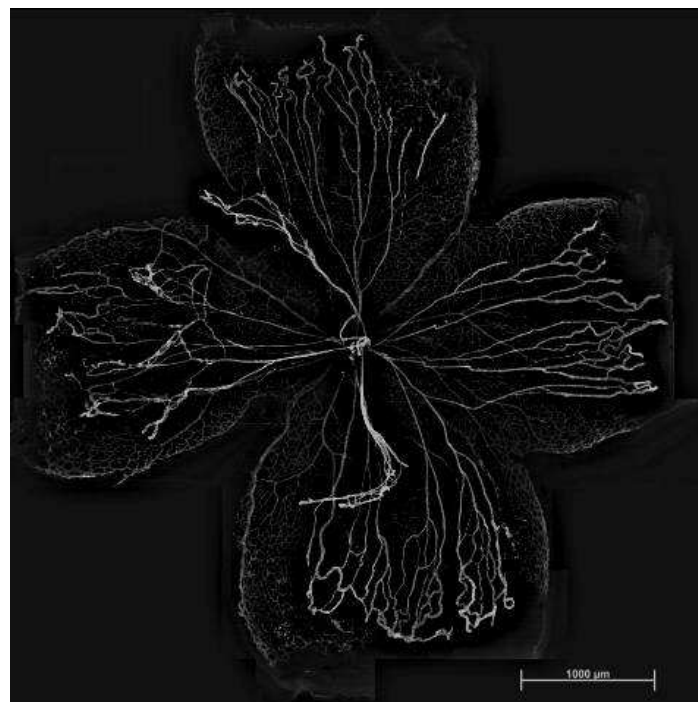
Die Retinapräparation gelang auf die oben genannte Art problemlos und über alle Altersstufen hinweg in ca. 90% der Fälle. Das Verweilen des Bulbus in der 4%igen PFA-Lösung stellte dabei einen wichtigen Schritt dar. Bei Zeiten unter 20 Minuten war die Retina noch zu weich und wenig formresistent, bei den gewählten Zeiten zwischen 45 und 60 Minuten trat dieses Problem nicht auf.

Als technisch schwierig erwies sich bei der Präparation im speziellen die Zirkumzision der Cornea, da es wichtig war, dort in Höhe der Ora serrata zu schneiden, um die Retina komplett und intakt zu erhalten. Des Weiteren stellte das Herausschälen der Retina aus der Choroidea einen komplizierten Punkt dar, da dort teilweise hohe Scherkräfte auf die



Retina einwirkten und Risse entstehen konnten. Zuletzt ist als kritischer Schritt das Ausspreiten der Retina in eine flache Form zu nennen, da auch hier Risse entstehen konnten bzw. schon vorhandene Risse deutlich Zunehmen konnten. Nach der Präparation wurde daher das jeweils bessere Präparat eines Tieres zur weiteren Anfärbung verwendet, die andere Retina wurde verworfen. Eine vollständig erhaltene Retina nach Anfärbung zeigt Abb. 3-10 C.

Die Präparation der 5- und 7-Tage alten Tiere gelang insgesamt weniger konstant in ca. 70% der Fälle. Die Entfernung der hyaloiden Gefäße wie unter 2.3.1 beschrieben gestaltete sich schwierig, da durch die Verwachsung dieser Gefäße sowohl mit dem centrum retinae als auch der äußeren Retina beim Entfernen häufig Defekte der Retina entstanden. Da die Gefäße nahezu unsichtbar sind, war die Gefahr gegeben, die eigentlich zu erhaltende Gefäßstruktur bei der Präparation zu beschädigen. Alles in allem ergab sich eine befriedigende, jedoch nicht optimale Qualität der Präparate 5- und 7-Tage alter Tiere. Vollständig erhaltene Retinae nach Anfärbung zeigen Abb. 3-10 A/B, während Abb. 3-4 die Retina eines 5-Tage alten Tieres zeigt, bei dem es nicht gelang die hyaloiden Gefäße zu entfernen.

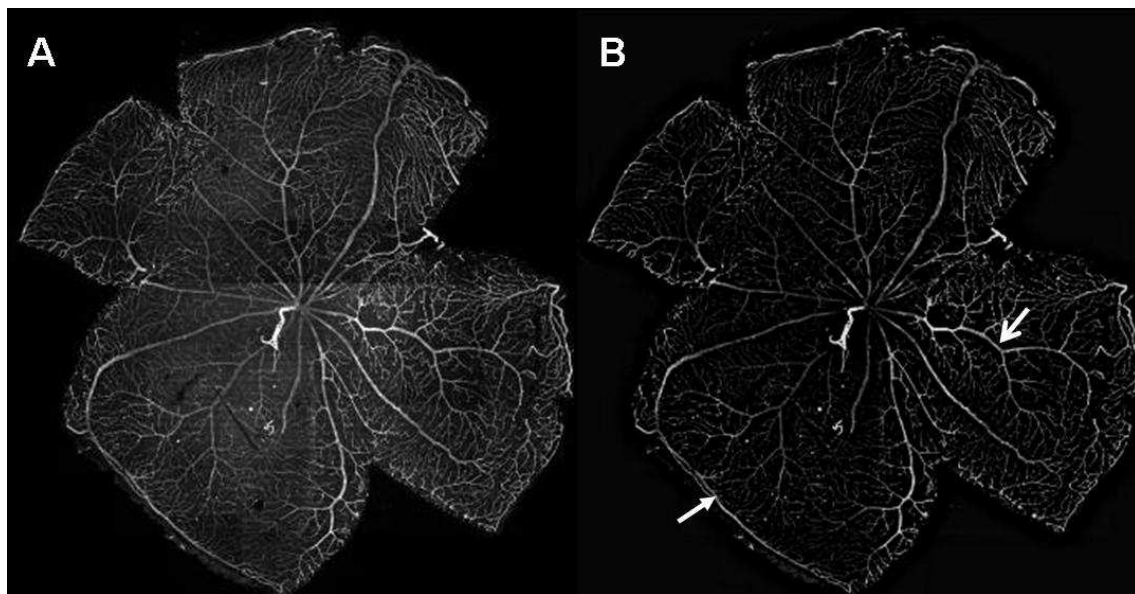


**Abb. 3-4: 5-Tage alte Retina mit ausgeprägtem hyaloidem Gefäßsystem;** Der eigentliche Plexus ist größtenteils überdeckt, eine Auswertung in dem Fall nicht möglich; Aufgenommen mit 100facher Vergrößerung; Maßstabsbalken= 1000 µm

### 3.2.2 GEFÄßANFÄRBUNG

Die Gefäßanfärbung mittels Kollagen IV-selektiven Antikörpern gelang in allen Fällen sehr gut, auch sehr kleine Kapillaren wurden unter Fluoreszenzlicht sichtbar und konnten ausgewertet werden. Das Aufbringen der Präparate auf die Objektträger und die Fixierung unter Deckgläsern gelang in nahezu allen Fällen ohne größere Probleme. Die Problematik der verdeckenden hyaloiden Gefäße bei sehr jungen Tieren wurde unter 2.3.1 und 3.2.1 bereits ausführlich beschrieben.

Die Selektivität der verwendeten Antikörper war hoch, mit Hilfe des ApoTome und der Nachbearbeitung durch die Software, konnten sehr rauscharme Bilder produziert werden (**Abb. 3-5**), womit die nun folgende Analyse der Retinae durchgeführt werden konnte. Die Ergebnisse der Auswertung werden in den nächsten Abschnitten ausführlich besprochen.



**Abb. 3-5: Gleiche Retina ohne (A) und mit (B) Nachbearbeitung;** Durch eine Shading Korrektur kann das noch störende Hintergrundrauschen weiter vermindert werden; Zu sehen sind Arterien (Zentral, stark verzweigt, großer Pfeil  $\leftarrow$ ) und Venen (Am Rand, wenige, kleine Zuflüsse, kleiner Pfeil  $\leftarrow$ ); Aufgenommen mit 100facher Vergrößerung

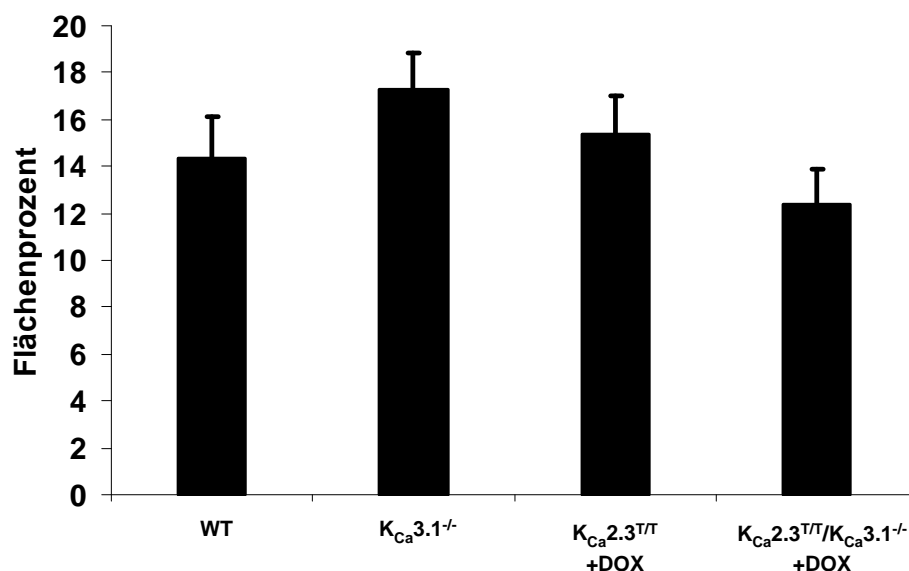
## 3.3 AUSWIRKUNG DES VERLUSTES VON $K_{Ca3.1}$ , $K_{Ca2.3}$ ODER BEIDER KANÄLE

Um die morphologischen Gefäßveränderungen quantitativ und qualitativ beurteilen zu können sollten zuerst die Auswirkungen des spezifischen, genetisch kodierten Knockout des  $K_{Ca3.1}$ , des  $K_{Ca2.3}$  oder beider Kanäle bei adulten Tieren untersucht werden. Die

angefertigten Präparate der Retinae wurden hierfür wie oben beschrieben angefertigt, mittels Immunfluoreszenzfärbung gegen Kollagen IV gefärbt und anschließend nach verschiedenen Kriterien ausgewertet.

### 3.3.1 FLÄCHENANALYSE

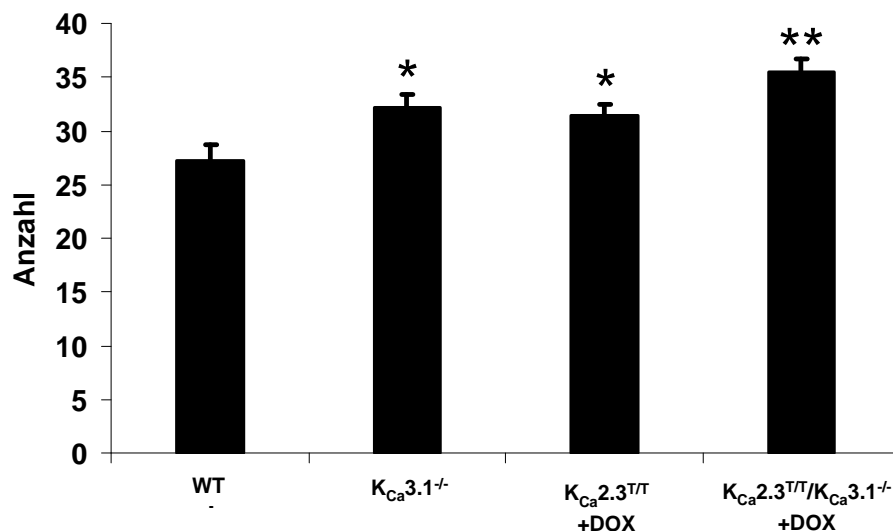
Bei der Analyse der Flächenverteilung mit dem Modul AutMess war es möglich, den prozentualen Anteil der Gefäße, die eine Retina bedecken, gemessen an der Gesamtfläche zu berechnen. Zu diesem Zweck wurden Graustufen als Grenzwerte definiert, innerhalb derer Grenzen das Programm ein Objekt als Gefäß erkennt (siehe 2.5.1). Bei der Auswertung fiel auf, dass von der Gesamtfläche der Retina sowohl bei  $K_{Ca}3.1^{-/-}$  (17,3 %) als auch bei  $K_{Ca}2.3^{T/T}$ -Tieren (15,3%) größere Anteile mit Gefäßen bedeckt sind als bei WT-Tieren (14,3%), Interessanterweise kehrt sich dieses Phänomen bei  $K_{Ca}2.3^{T/T}/K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Tieren (12,4%) ins Gegenteil um und der mit Gefäßen bedeckte Flächenanteil wird kleiner als bei WT-Tieren. Jedoch ist keiner der Unterschiede so groß, dass eine Signifikanzschwelle erreicht wird.



**Abb. 3-6: Flächenanalyse adulter Tiere;** Auf der X-Achse sind die verschiedenen Genotypen, auf der Y-Achse die Prozentzahl der mit Gefäßen bedeckten Fläche gemessen an der Gesamtfläche der Retina, abzulesen. Angegeben sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler; n=6 bei den ersten drei Gruppen, n=5 bei der vierten Gruppe

### 3.3.2 ANALYSE DER VERZWEIGUNGEN

Um eine Auswertung der Verzweigungen zu erhalten wurde in die Retina ein Kreis mit definiertem Radius (1000  $\mu\text{m}$ ) gelegt und anschließend in jedem der vier Quadranten der Retina ein Quadrat mit 603,72  $\mu\text{m}$  Kantenlänge mit Kontakt zu dem Kreis eingefügt (siehe 2.5.2). Innerhalb dieser Quadrate wurden die Verzweigungen markiert und ausgezählt, wobei der Mittelwert aller vier Quadrate den jeweiligen Wert der Retina darstellte. Es zeigte sich eine signifikante Vermehrung der Verzweigungen sowohl bei den  $K_{Ca3.1}^{-/-}$  (P-Wert 0,027, adjustiert 0,080) als auch den  $K_{Ca2.3}^{TT}$ -Tieren (P-Wert 0,043, adjustiert 0,127) gegenüber den Wildtypen, womit gezeigt werden konnte, dass ein Knockout von  $K_{Ca3.1}$  und  $K_{Ca2.3}$  zu einer Vermehrung der Gefäßverzweigung führte. Signifikant erhöht waren insbesondere die Verzweigungen bei einem Knockout beider Kanäle (P-Wert 0,002, adjustiert 0,007 \*\*).

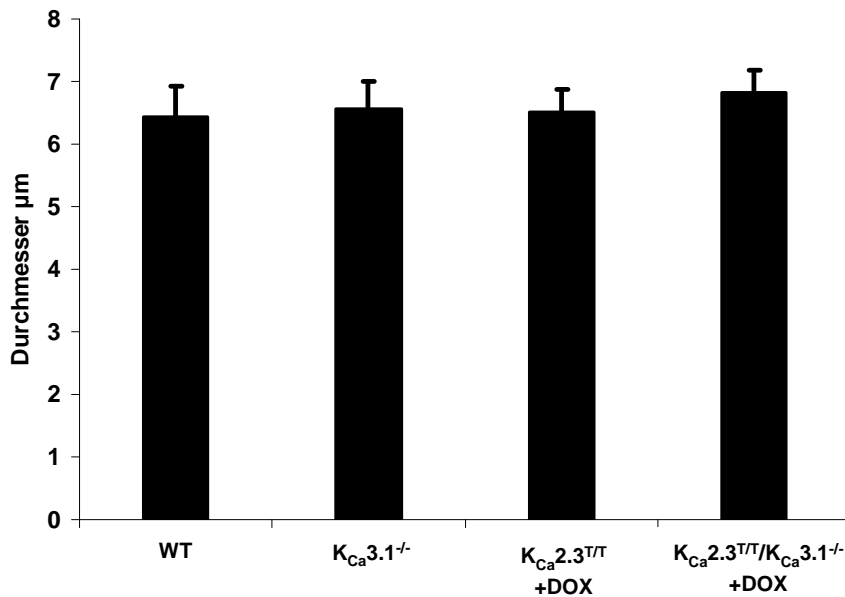


**Abb. 3-7: Analyse der Verzweigungen adulter Tiere;** Auf der X-Achse sind die verschiedenen Genotypen, auf der Y-Achse die Anzahl der Verzweigungen abzulesen. Zu erkennen ist eine signifikante Vermehrung der Verzweigungen bei spezifischem Knockout eines oder beider Kanäle; Angegeben sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ;  $n=5$  bei den Gruppen 1, 2, 4,  $n=6$  bei Gruppe 3

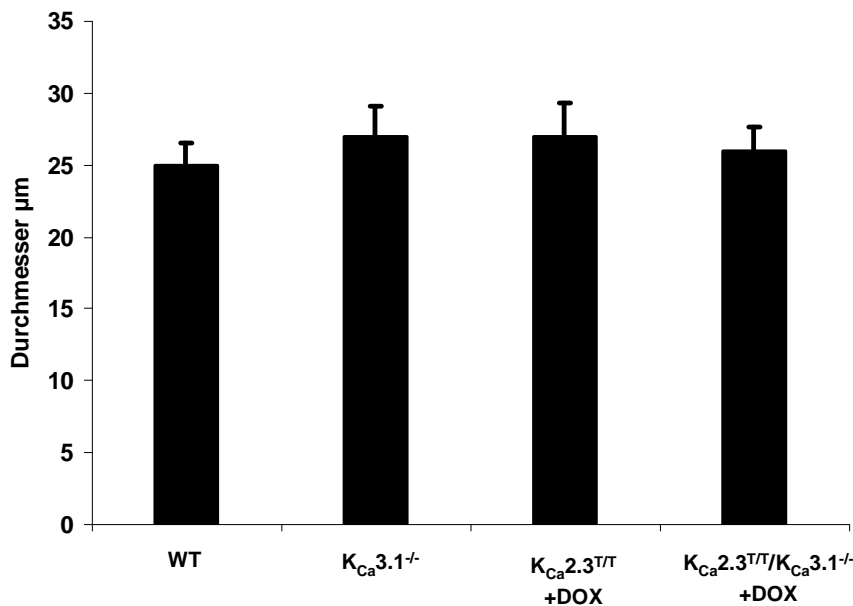
### 3.3.3 ANALYSE DER DURCHMESSER

Um zu überprüfen, ob die erhöhte Zahl der Verzweigungen mit dem Durchmesser der Gefäße korrelierte, wurde in jedem der bereits unter 3.3.2 verwendeten Quadrate willkürlich sechs Endkapillaren gewählt und vermessen. Zusätzlich wurden auch die Hauptäste der A. centralis retinae auf Höhe des Kreisumfangs ausgemessen.

Somit bekam man pro Retina die Durchmesser von 24 Kapillaren und 3-6 Hauptästen. Der Auswertung sowohl für Endkapillaren (**Abb. 3-8**) als auch für große arterielle Gefäße (**Abb. 3-9**) konnte entnommen werden, dass es keine Unterschiede bei den Gefäßdurchmessern gab. Es fand demnach kein Ausgleich der größeren Zahl von Verzweigungen durch einen kleineren Gefäßdurchmesser statt.



**Abb. 3-8: Durchmesser kleiner Kapillaren bei adulten Tieren;** Auf der X-Achse sind die verschiedenen Genotypen, auf der Y-Achse der Gefäßdurchmesser in µm abzulesen; Angegeben sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler; n=6 bei den ersten drei Gruppen, n=5 bei der vierten Gruppe

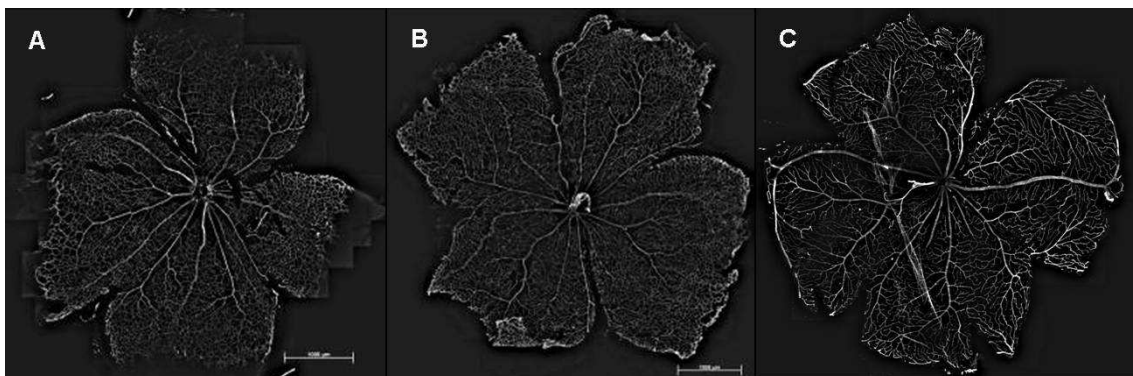


**Abb. 3-9: Durchmesser großer Arterien bei adulten Tieren;** Auf der X-Achse sind die verschiedenen Genotypen, auf der Y-Achse der Gefäßdurchmesser in µm abzulesen; Angegeben sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler; n=6 bei den ersten drei Gruppen, n=5 bei der vierten Gruppe

### 3.4 UNTERSCHIEDE WACHSENDER GEFÄßSYSTEME VON 5- UND 7-TAGE ALTEN MÄUSEN

Ein großer Vorteil des Retina-Modells bestand darin, dass auch die in der Entwicklung befindlichen Gefäßnetze erfasst und ausgewertet werden konnten, da diese erst 18 Tage postpartal ihre endgültige Reife erreichen. In den angefärbten Retinae konnte man sehr gut die unterschiedlich weit fortgeschrittene Vaskularisierung erkennen (**Abb. 3-10**). Ebenso erkannte man deutlich die zu diesem Zeitpunkt vorliegende primäre Gefäßschicht im Gegensatz zu den drei Kapillarnetzen, die in einer adulten Retina zu differenzieren sind.

Hier sollte nun untersucht werden, ob sich bereits in der Entwicklung des Gefäßnetzes Unterschiede manifestierten. Die Auswertung fand analog zu den adulten Tieren statt, Auf eine erneute Analyse der Gefäßdurchmesser wurde aufgrund der nicht-messbaren Unterschiede bei den adulten Tieren verzichtet.

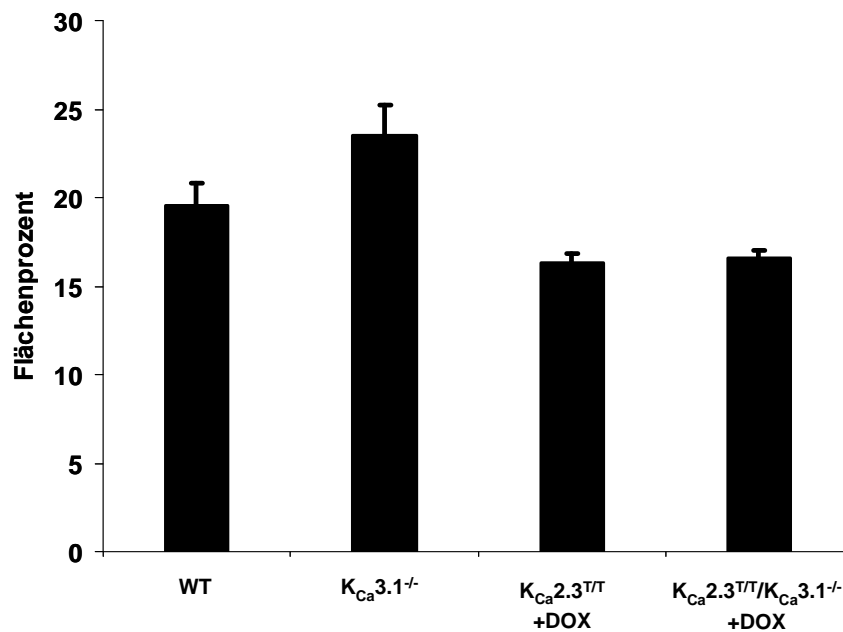


**Abb. 3-10: Fertige Präparate verschiedener Altersstufen; A:** 5-Tage alte Retina, das Gefäßnetz ist noch nicht bis an den Rand der Retina gewachsen; **B:** Der Rand der Retina ist mit Gefäßen bedeckt, die tiefen Plexus sind noch nicht ausgebildet **C:** Adulte Retina, alle Plexus sind voll ausgebildet; Aufgenommen mit 100facher Vergrößerung; Maßstabsbalken= 1000  $\mu\text{m}$

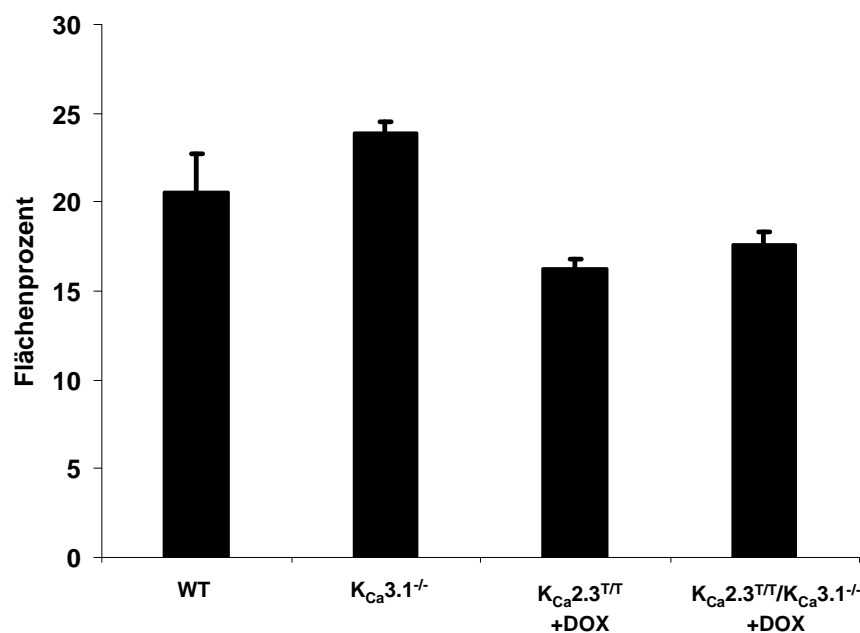
#### 3.4.1 FLÄCHENANALYSE

Diese Art der Auswertung gestaltete sich schwierig, da präparationsbedingt nicht immer die hyaloiden Gefäße entfernt werden konnten (siehe auch 2.3.1). Da speziell die hyaloiden Gefäße sehr stark durch den Fluoreszenzfarbstoff angefärbt wurden, war die automatische Auswertung wegen den Überlagerungen teilweise nur eingeschränkt möglich. In beiden Altersstufen, sowohl bei den fünf als auch bei den sieben Tage alten Tieren, sind bei den  $K_{Ca}3.1^{-/-}$  Tieren ein größerer Anteil der Gesamtfläche mit Gefäßen bedeckt, während sowohl bei den  $K_{Ca}2.3^{T/T}$  Tieren als auch bei den  $K_{Ca}3.1^{-/-}/K_{Ca}2.3^{T/T}$

doppeltransgenen Tieren ein kleinerer Anteil der Gesamtfläche mit Gefäßen bedeckt ist. Signifikanzschwellen werden bei beiden Altersstufen nicht erreicht (**Abb. 3-11, Abb. 3-12**)



**Abb. 3-11: Flächenanalyse 5-Tage alter Tiere;** Auf der X-Achse sind die verschiedenen Genotypen, auf der Y-Achse die Prozentzahl der mit Gefäßen bedeckten Fläche gemessen an der Gesamtfläche der Retina abzulesen; Angegeben sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler; n=7 bei der ersten Gruppe, n=5 bei den Gruppen 2, 3, 4



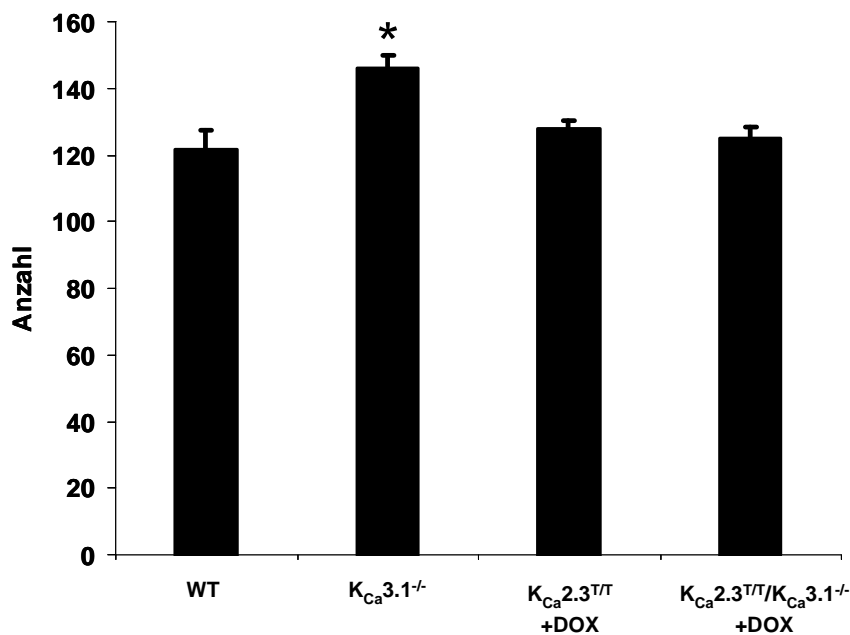
**Abb. 3-12: Flächenanalyse 7-Tage alter Tiere;** Auf der X-Achse sind die verschiedenen Genotypen, auf der Y-Achse die Prozentzahl der mit Gefäßen bedeckten Fläche gemessen an der Gesamtfläche der Retina abzulesen; Angegeben sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler; n=5 bei allen Gruppen

### 3.4.2 ANALYSE DER VERZWEIGUNGEN

Auch bei den jungen Tieren sollten die Verzweigungen der Gefäße innerhalb der Retina quantitativ erfasst werden. Wie schon unter 2.5.2 beschrieben, wurden die Abzweigungen jedoch nicht direkt gezählt, sondern stattdessen die von den Gefäßen umgeben Areale.

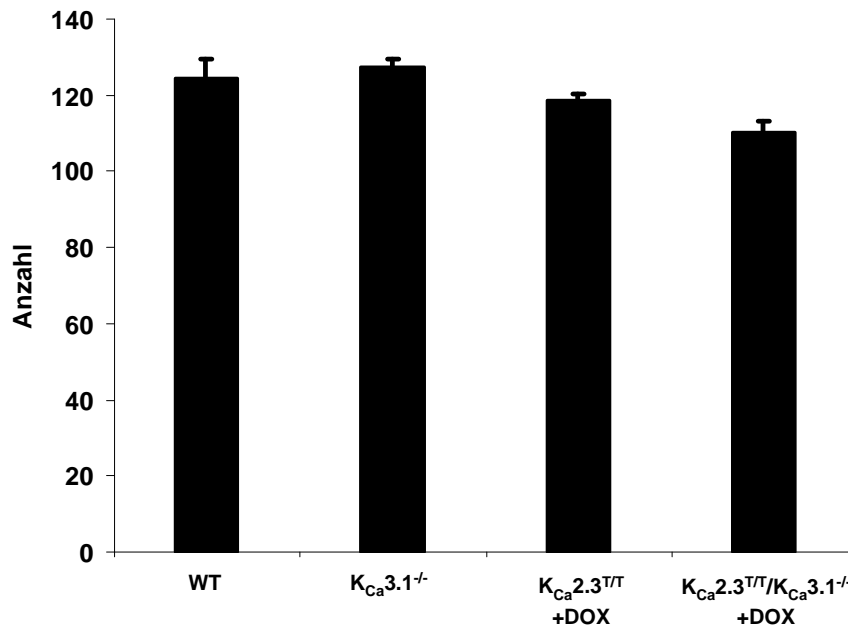
Tendenziell zeigten sich, verglichen mit den adulten Tieren, ähnliche Ergebnisse. Bei den fünf Tage alten Tieren wiesen alle drei untersuchten Gruppen eine höhere Anzahl von gefäßumgebenden Arealen auf, wobei die  $K_{Ca}3.1^{-/-}$  Tiere den höchsten und auch signifikanten Unterschied aufwiesen (P-Wert 0,012, adjustiert 0,036 \*). Die Unterschiede bei den  $K_{Ca}2.3^{T/T}$  Tieren als auch bei den  $K_{Ca}3.1^{-/-}/K_{Ca}2.3^{T/T}$  doppeltransgenen Tieren waren geringer und nicht signifikant (**Abb. 3-13**).

Bei den sieben Tage alten Tieren lagen alle ausgezählten Werte eng beieinander und es konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden (**Abb. 3-14**).



**Abb. 3-13: Analyse der Verzweigungen 5-Tage alter Tiere;** Auf der X-Achse sind die verschiedenen Genotypen, auf der Y-Achse die Anzahl der Verzweigungen abzulesen. Zu erkennen ist eine signifikante Vermehrung der Verzweigungen bei spezifischem Knockout des  $K_{Ca}3.1$ ; Angegeben sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler; \* =  $p < 0,05$ ;  $n=7$  bei der ersten Gruppe,  $n=5$  bei den Gruppen 2, 3, 4





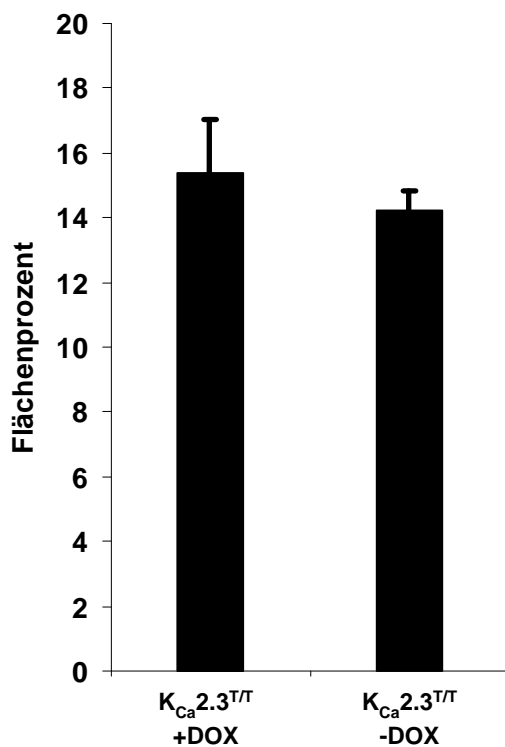
**Abb. 3-14: Analyse der Verzweigungen 7-Tage alter Tiere;** Auf der X-Achse sind die verschiedenen Genotypen, auf der Y-Achse die Anzahl der Verzweigungen abzulesen; Angegeben sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler; n=5 bei allen Gruppen

### 3.5 ÜBEREXPRESSION VON $K_{Ca2.3}$ UND KOMPENSATION VON $K_{Ca3.1}$ -KNOCKOUT

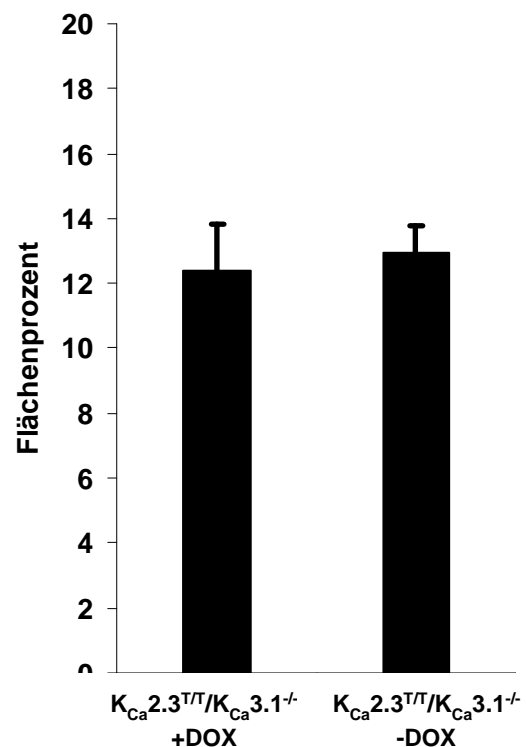
Ziel dieser Untersuchung sollte die Überprüfung sein, ob die beobachteten Unterschiede bei einem Knockout des  $K_{Ca3.1}$  durch eine Überexpression von  $K_{Ca2.3}$  kompensiert werden konnten, bzw. wie sich eine Überexpression von  $K_{Ca2.3}$  insgesamt auf die Angiogenese auswirkt. Durch das  $K_{Ca2.3}^{T/T}$  transgene Tiermodell gab es eine gute Möglichkeit durch das Verzichten der Gabe von Doxzyklin nach der Geburt eine Überexpression des  $K_{Ca2.3}$  zu erhalten. Bei dieser Untersuchung war es jedoch nicht möglich, die Veränderung bei sehr jungen Tieren durchzuführen, da während der Gravidität eine DOX-Gabe wegen der mehrfach beschriebenen Probleme während der Austreibungsphase (siehe 1.5.2 und 2.2.2) obligat war. Da es mehrere Tage benötigte, bis nach Absetzen des Doxzyklin eine Überexpression der Kanäle durch vermehrte Genexpression eintrat, kann die Entwicklung von 5- und 7-Tage alten Tieren unter dem Gesichtspunkt der Überexpression des  $K_{Ca2.3}$  nicht sinnvoll erfolgen, weshalb darauf verzichtet wurde.

### 3.5.1 FLÄCHENANALYSE

Im Vergleich zu dem Knockout des Kanals  $K_{Ca2.3}$  zeigten sich bei der ca. dreifachen Überexpression des Kanals (siehe 1.5.3) keine signifikanten Unterschiede was die mit Gefäßen bedeckten Anteile anging (Abb. 3-15). Auch bei den doppeltransgenen Tieren zeigten sich keine Unterschiede wenn man die Gruppe  $K_{Ca3.1}$  und  $K_{Ca2.3}$  Knockout gegen  $K_{Ca3.1}$  Knockout und  $K_{Ca2.3}$  Überexpression verglich (Abb. 3-16).



**Abb. 3-15: Vergleich Flächenanalyse  $K_{Ca2.3}^{T/T}$  +/- DOX;** Auf der X-Achse sind die verschiedenen Genotypen, auf der Y-Achse die Prozentzahl der mit Gefäßen bedeckten Fläche gemessen an der Gesamtfläche der Retina abzulesen; Angegeben sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler; n=6



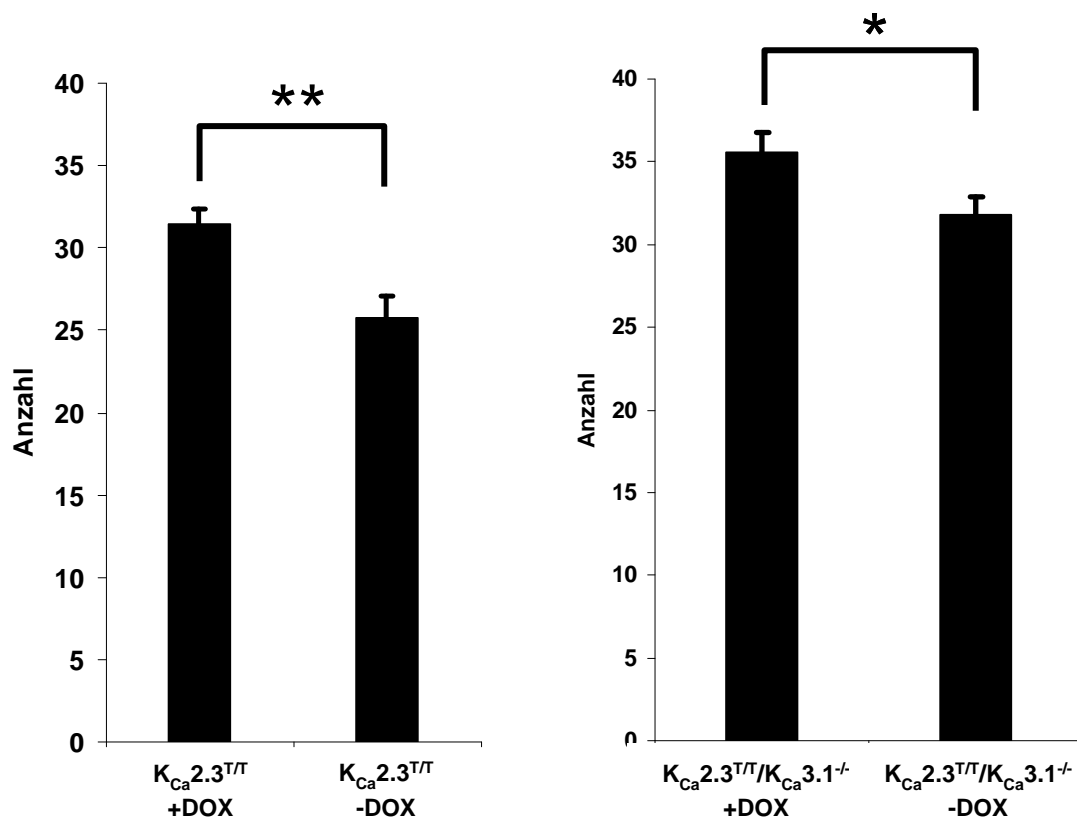
**Abb. 3-16: Vergleich Flächenanalyse  $K_{Ca2.3}^{T/T}/K_{Ca3.1}^{-/-}$  +/- DOX;** Auf der X-Achse sind die verschiedenen Genotypen, auf der Y-Achse die Prozentzahl der mit Gefäßen bedeckten Fläche gemessen an der Gesamtfläche der Retina abzulesen; Angegeben sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler; n=5

### 3.5.2 ANALYSE DER VERZWEIGUNGEN

Wenn man die Anzahl der Gefäßverzweigungen zwischen den  $K_{Ca2.3}^{T/T}$  transgenen Tieren mit und ohne Doxyzyklin-Behandlung betrachtete, fiel eine signifikante Verringerung der Gefäßverzweigungen bei der Überexpression von  $K_{Ca2.3}$  auf (Abb. 3-17; P-Wert 0,006, adjustiert 0,013 \*). Die stärkere Verzweigung der Tiere mit Knockout gegenüber den Wildtieren wurde durch die Überexpression ins Gegenteil umgekehrt. Somit lag bei den  $K_{Ca2.3}$  überexprimierenden Tieren eine geringere Verzweigungszahl gegenüber den Wildtypen vor ( $p > 0,05$ ).

Bei den  $K_{Ca3.1}^{-/-} / K_{Ca2.3}^{T/T}$  doppeltransgenen Tieren zeigte sich ebenfalls eine signifikante Unterscheidung zwischen der Behandlung mit und ohne DOX (Abb. 3-18; P-Wert 0,044, adjustiert 0,087). Wie bereits unter 3.3.2 beschrieben führte der Doppelknockout beider Kanäle zu einem signifikanten Ansteigen der Gefäßverzweigungen. Dieser Anstieg wurde durch die Überexpression des  $K_{Ca2.3}$  teilweise kompensiert und die Gefäßverzweigung war gegenüber den Wildtypen signifikant, jedoch deutlich geringer erhöht.

Die Signifikanzunterschiede der Gruppen mit und ohne Überexpression untereinander bestätigten die hier verwendete Methodik insofern, als dass die hier gewonnenen Ergebnisse untereinander schlüssig sind. Eine weitergehende Interpretation der Ergebnisse soll in den folgenden Abschnitten erfolgen.



**Abb. 3-17: Vergleich Verzweigungen  $K_{Ca2.3}^{T/T}$  +/- DOX;** Auf der X-Achse sind die verschiedenen Genotypen, auf der Y-Achse die Anzahl der Verzweigungen abzulesen. Die Überexpression des Kanals  $K_{Ca2.3}$  führt zu einer signifikanten Verringerung der Gefäßverzweigungen. Angegeben sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler; \*\* =  $p < 0,01$ ;  $n=6$

**Abb. 3-18: Vergleich Verzweigungen  $K_{Ca2.3}^{T/T}/K_{Ca3.1}^{-/-}$  +/- DOX;** Auf der X-Achse sind die verschiedenen Genotypen, auf der Y-Achse die Anzahl der Verzweigungen abzulesen. Bei der doppeltransgenen Gruppe führt die Überexpression des  $K_{Ca2.3}$  zu einer teilweisen Kompensation des  $K_{Ca3.1}$ -Knockout. Angegeben sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler; \* =  $p < 0,05$ ;  $n=5$

## 4 DISKUSSION

In dieser Dissertation sollte die funktionelle Bedeutung der Ionenkanäle  $K_{Ca3.1}$  und  $K_{Ca2.3}$  bei Angiogeneseprozessen verschiedener Entwicklungsstufen muriner Retinae *in vivo* untersucht werden. Für den Kanal  $K_{Ca3.1}$  lagen bislang nur wenige Untersuchungen zur Angiogenese vor (Grgic, Eichler et al. 2005), zu  $K_{Ca2.3}$  keine. Zur Untersuchung von sich entwickelnden Gefäßnetzen wurde im Rahmen dieser Arbeit die immunhistochemisch angefärbte murine Retina als Standardmodell in unserer Arbeitsgruppe etabliert. Als Tiermodelle fungierten die vorliegenden  $K_{Ca3.1}^{-/-}$  und  $K_{Ca2.3}^{T/T}$  transgenen Tiere sowie das  $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T}$  doppeltransgene Tiermodell, welche teilweise in unserer Arbeitsgruppe generiert wurden und etabliert sind (Bond, Sprengel et al. 2000; Si, Heyken et al. 2006; Brähler, Kaistha et al. 2009). Ziel war es herauszufinden, ob ein spezifischer Knockout eines oder beider Kanäle zu einer Veränderung in der Gefäßmorphologie und Morphometrie sowohl bei sich entwickelnden als auch in der Entwicklung abgeschlossenen Retinae führt. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob der Knockout des  $K_{Ca3.1}$  durch die Überexpression des  $K_{Ca2.3}$  kompensiert werden kann.

Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Knockout der Kanäle  $K_{Ca3.1}$  und  $K_{Ca2.3}$ , einzeln wie auch gemeinsam, zu morphologischen Veränderungen am Gefäßnetz der Retina führen, indem ihr Fehlen zu einer signifikanten Zunahme der Gefäßverzweigung, nicht jedoch zu einer Veränderung der Gefäßdurchmesser, führt. Ferner konnte gezeigt werden, dass ein Knockout des  $K_{Ca3.1}$  durch eine Überexpression des  $K_{Ca2.3}$  teilweise kompensiert werden kann. Als erstes sollen hier nun die wesentlichen Punkte meiner Arbeit betrachtet und diskutiert werden.

### 4.1 PHÄNOTYP UND DOXYZYKLIN-GABE

Alle in dieser Arbeit verwendeten Tiermodelle waren in der Lage gesunde Nachkommen zu zeugen. Vom äußeren Erscheinungsbild inklusive Körpergröße und -gewicht zeigten sich keine Auffälligkeiten, weder bei den Jungtieren noch bei den adulten Tieren. Verhaltensauffälligkeiten wurden in keiner Gruppe beobachtet. Die beschriebenen Probleme bei der Austreibungsphase konnten durch die Gabe von Doxzyklin unter der

Gravidität suffizient verhindert werden (siehe 2.2.2). Orientierende morphologische Untersuchungen zeigten, wie auch schon frühere Untersuchungen, keine Unterschiede in Bezug auf Größe, Gewicht und Morphologie der Organe, mit Ausnahme einer milden Splenomegalie in adulten  $K_{Ca}3.1^{-/-}$  und  $K_{Ca}3.1^{-/-}/K_{Ca}2.3^{T/T}$ -Tieren. (Bond, Sprengel et al. 2000; Taylor, Bonev et al. 2003; Si, Heyken et al. 2006; Brähler, Kaistha et al. 2009).

Die hier verwendeten Tiere zeigten auch bei längerer Gabe von Doxzyklin über 30 Tage keine erkennbaren Auffälligkeiten in Verhalten oder Phänotyp. Somit wurde erneut bestätigt, dass der Knockout eines oder beider Kanäle sowie die Überexpression des  $K_{Ca}2.3$  mit dem Leben vereinbar ist.

## 4.2 ANALYSEVERFAHREN ADULTER UND JUVENILER RETINAE

Ein erstes zentrales Ziel dieser Arbeit war es, ein computergestütztes Auswerteverfahren für die qualitative und quantitative Charakterisierung der Retinavaskularisierung bei  $K_{Ca}$ -transgenen Tieren zu etablieren. Für die mikroskopische Untersuchung stand mit dem inversen Forschungsmikroskop Axio Observer ein Gerät neuester Technik zur Verfügung. Für die Auswertung wurde das Programm Axio Vision (Version 4.7.2, Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet. Bei der Auswahl geeigneter Analyseverfahren wurde auf bereits verwendete Methoden zurückgegriffen (Hellstrom, Phng et al. 2007; Kasai, Shintani et al. 2008). Diese wurden modifiziert um den spezifischen Gegebenheiten und Erfordernissen der vorliegenden Studie gerecht zu werden. Dies soll in den nächsten Abschnitten genauer erläutert werden.

### 4.2.1 ANALYSE DER FLÄCHE

Eine nahe liegende Art der Auswertung war die Analyse der mit Gefäßen bedeckten Fläche, gemessen an der Gesamtfläche. Hier war speziell wichtig, das verwendete automatische Auswertesystem (AxioVision – Version 4.7.2, Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland) für eine eindeutige Identifizierung einer Gefäßstruktur zu programmieren. Der Weg über eine Grauwertanalyse erschien hier prinzipiell sinnvoll, zu beachten war hierbei insbesondere, dass gut definierte Grenzwerte gesetzt werden. Diese sollten bei der Analyse eine natürliche Variation der Anfärbeintensität und des verschieden stark

ausgeprägten Hintergrundrauschens der Präparate berücksichtigen. Für die vorliegende Untersuchung wurden daher dynamische Grenzwerte für die Berechnung der Grauwerte verwendet, die ein Hintergrundrauschen herausfilterten und dennoch eine eindeutige Identifizierung der Gefäßstrukturen ermöglichen sollten. Für einen Teil der Präparate, speziell der 5- und 7-Tage alten Tiere, erwies sich dieses Verfahren wegen der teilweise noch vorhandenen hyaloiden Gefäße allerdings als nicht praktikabel (siehe. 3.4.1). Folglich konnten nicht alle Präparate berücksichtigt werden.

Insgesamt wurden im Schnitt 5,4 Präparate je genetischer Gruppe in die Auswertung einbezogen. Der Vergleich der Mittelwerte in den jeweiligen Gruppen ergab keine signifikanten Unterschiede, weder in der Gesamtgefäßfläche von sich entwickelnden, noch der fertig entwickelten Retinae. Bei dieser Art der Auswertung muss kritisch bemerkt werden, dass die hier verwendete, computergestützte Bildauswertung aufgrund der herstellungsbedingten unterschiedlichen Anfärbbarkeit der Präparate technisch ausreichend praktikabel war. Hier war die mit Gefäßen bedeckte Gesamtfläche gut quantifizierbar, jedoch wurden speziell kleine, gering angefärbte Gefäße von der Software häufig nicht als Gefäß erkannt.

#### **4.2.2 ANALYSE DER VERZWEIGUNGEN**

Um potentielle Veränderungen der Gefäßmorphologie in den jeweiligen Versuchgruppen zu erfassen, wurde der Grad der Gefäßramifizierung bestimmt. Hierzu wurden alle Gefäßabzweigungen innerhalb eines definierten Gebietes markiert und anschließend von der Softwaregestützt quantifiziert (siehe 2.5.2). Diese Analyse lies Rückschlüsse auf die Dichte des Gefäßnetzes zu, denn es ließen sich durch dieses Verfahren sehr gut reproduzierbare Befunde erheben, da Verzweigungen optisch klar definiert sind. Insbesondere durch Verwendung des ApoTome und dessen mechanisch-optischer Verrechnung (siehe 2.4) gelang eine sehr gute optische Auflösung des Gefäßsystems in einer Ebene des Präparates.

Dieses Verfahren erwies sich auch für die Analyse der Präparate junger Tiere als sinnvoll, wobei eine kleine Anpassung der Auswertung erforderlich war. Durch das viel dichtere Kapillarnetz wurden einzelne Abzweigungen zunehmend schwerer identifizierbar und quantifizierbar. Gut abgrenzbar waren jedoch vollständig von Gefäßen umgebene Areale. Da die Anzahl dieser Gebiete mit dem Grad der Verzweigung ebenso an-

steigen, konnte ein vergleichbares Maß für die Ramifizierung gewonnen werden (siehe 2.5.2).

Bezüglich des Grades der Gefäßramifizierung ergab diese Untersuchung, dass bei adulten  $K_{Ca3.1}^{-/-}$  oder  $K_{Ca2.3}^{T/T}$ -Tieren eine signifikante Erhöhung vorlag. Der Knockout beider Kanäle führte zu einer weiteren Erhöhung der Anzahl der Verzweigungen.

Es zeigte sich ferner, dass eine Überexpression des Kanals  $K_{Ca2.3}$  gegenüber dessen Knockout sowohl bei den  $K_{Ca2.3}^{T/T}$ - als auch bei den  $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T}$ -Tieren zu einer signifikanten Verringerung der Ramifizierung führte (siehe 3.5.2). Somit lässt sich feststellen, dass ein Fehlen der Kanäle zu einer Zunahme der Anzahl der Verzweigungen und somit der Gefäßdichte führte.

Bei den 5- und 7-Tage alten Tieren konnte eine Tendenz zu höherer Gefäßverzweigung bei den gleichen Gruppen gezeigt werden, jedoch wurde nur in einer Gruppe die Signifikanzschwelle von  $P < 0,05$  überschritten. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Unterschiede während der Gefäßentwicklung weniger deutlich hervortreten und dadurch (noch) keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.

#### 4.2.3 ANALYSE DER DURCHMESSER

In dieser Arbeit konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass die Durchmesser sowohl der großen Arterien als auch der kleinen Endkapillaren durch den spezifischen Knockout der untersuchten Kanäle nicht beeinflusst wurden. Es wäre denkbar gewesen, dass die größere Dichte des Gefäßnetzes durch kleinere Durchmesser der Einzelgefäße kompensiert werden, dieses war jedoch nicht der Fall wie unter 3.3.3 gezeigt. In einer Arbeit von Taylor, Bonev et al. wurde beschrieben, dass der arterielle Gefäßdurchmesser bei Überexpression des  $K_{Ca2.3}$  erhöht war. Dies konnte, zumindest was das retinale arterielle Gefäßbett angeht, hier nicht bestätigt werden.

Die hier verwendete Methode, innerhalb definierter Quadrate sowohl Endkapillaren als auch große arterielle Gefäße auszumessen, hatte eine hohe Replizierbarkeit und war kaum untersucherabhängig. Dadurch eignete sie sich gut zur morphologischen Untersuchung des dargestellten Gefäßnetzes. Ein kleines Problem bestand jedoch darin, dass das Modul IntMess keine kontinuierliche Messung erlaubte, sondern in ca.  $0,15 \mu m$  Schritten sprang. Gemessen an dem Gesamtdurchmesser ist dieser Messfehler jedoch vernachlässigbar.



### 4.3 VERGLEICHE DER ERGEBNISSE MIT BESTEHENDEN BEFUNDEN

Im Folgenden sollen nun die hier gewonnenen Erkenntnisse mit den bisher beschriebenen Befunden verglichen werden, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede diskutieren zu können. Wie bereits Eingangs erwähnt sind die bisherigen Untersuchungen des Einflusses von  $K_{Ca}$  auf Angiogeneseprozesse interessant, wenngleich spärlich (Taylor, Bonnev et al. 2003, Grgic, Eichler et al. 2005), so dass eine intensivere Forschung auf diesem Gebiet wünschenswert war.

#### 4.3.1 IONENKANÄLE BEI RETINALEN ANGIOGENESEPROZESSEN

Es stellte sich die Frage, welche Erkenntnisse zu Ionenkanälen und deren Rolle auf retinale Angiogeneseprozesse bisher bekannt waren. In einer Studie über CLIC (Chloride intracellular channel, intrazelluläre Chlorid-Kanäle) konnte gezeigt werden, dass bei einer Knockout-Mutante des CLIC4-Gens die mit Gefäßen bedeckte Fläche, die Länge der Gefäße sowie die Anzahl der Gefäßverzweigungen der Retina signifikant reduziert waren. Als Erklärung wurde die verminderte Ansäuerung von Vakuolen in proliferierenden Endothelzellen genannt (Ulmasov, Bruno et al. 2009).

Des Weiteren wurde dargestellt, dass bei Hypoxie der Retina die Kanäle Kir4.1 (Kalium inverted rectifier) und Aqp4 (Aquaporin), am ehesten als Reaktion auf ein entstehendes Ödem, herunterreguliert werden (Rehak, Hollborn et al. 2009). Abgesehen von diesen Befunden lagen für die genaue physiologische Entschlüsselung der Rolle von Ionenkanälen bei Angiogeneseprozessen der Retina keine Befunde vor. Hier konnte ich zeigen, dass die hier verwendeten  $Ca^{2+}$  abhängigen  $K^+$  Kanäle einen quantifizierbaren Einfluss ausübten. Dies wird nun im Folgenden genauer diskutiert.

#### 4.3.2 EINFLUSS VON $K_{Ca3.1}$ UND $K_{Ca2.3}$ AUF RETINALE ANGIOGENESEPROZESSE

In der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung von Angiogeneseprozessen in der murinen Retina konnte ich zeigen, dass ein genetischer Verlust von  $K_{Ca3.1}$  und von  $K_{Ca2.3}$  zu einer vermehrten Verzweigung des Gefäßplexus im Auge führte. Ein Knockout beider Kanäle hatte einen auf die Kapillardichte gesehen synergistischen Effekt. Aufgrund der sehr dezenten Veränderungen scheinen beide Kanäle jedoch kein unabdingbarer Bestandteil der Steuerungsmechanismen für Gefäßproliferation zu sein.

Bezüglich der Funktion der Kanäle für Ionentransportvorgänge der Zellmembran ist sehr gut belegt, dass eine Aktivierung der  $K_{Ca}$ -Kanäle zu einer starken Hyperpolarisation der Zellmembran führt und im Folgenden die elektrochemische Triebkraft für einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom erhöht wird. Die konsekutive Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration ist von übergeordneter Bedeutung für eine Vielzahl von Signaltransduktionsvorgängen, unter anderem auch von endothelialen Zellproliferationsvorgängen (Kohn, Alessandro et al. 1995). Daher könnten durch eine Manipulation von  $Ca^{2+}$ -Einstrom gesteuerten Hyperpolarisationsprozessen auch Angiogenesevorgänge verändert sein. Die vorliegende Arbeit zeigte jedoch, dass durch den Verlust der  $K_{Ca}$ -Kanäle und eine potentiell resultierende Verminderung des hyperpolarisationsgesteuerten  $Ca^{2+}$ -Einstroms Angiogenesevorgänge der murinen Retina nicht beeinflusst werden und sich im Gegenteil verbessert darstellten. Hier muss jedoch berücksichtigt werden, dass möglicherweise Kompensationsmechanismen den Verlust der Kanäle in der Retina mehr als ausgleichen und eine verbesserte Verzweigung der Gefäßnetze ermöglichen.

#### 4.4 MÖGLICHE THERAPEUTISCHE PERSPEKTIVEN

Proliferative Gefäßerkrankungen stellen ein großes Problem unserer Zeit dar, allen voran die diabetische Retinopathie, welche die häufigste Erblindungsursache bei Menschen zwischen 20 und 65 Jahren in Europa darstellt. Auch die altersbezogene Makuladegeneration, die häufigste Erblindungsursache des Menschen über 65 Jahren, ist in diesem Zusammenhang zu nennen (Kanski, Burk et al. 2008). An diesen proliferativen Erkrankungen wird seit längerem intensiv geforscht, um auf molekularer Ebene Therapien zu entwickeln. Ein genaues Verständnis ablaufender physiologischer und pathologischer Prozesse ist dafür unumgänglich. Erste Erfolge dieser Forschung stellen die Entwicklung neuartiger Medikamente dar, unter anderem des spezialisierten monoklonalen Antikörper Ranibizumab (Handelsname Lucentis®), der in den Glaskörper injiziert spezifisch alle Unterformen des humanen VEGF-A (vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor A) bindet und somit eine überschießende Gefäßproliferation im Auge verhindern bzw. reduzieren kann. Anhand solcher Beispiele wird der direkte Einfluss molekularer Forschung auf die Therapieformen der Zukunft sichtbar. Inwieweit die Beeinflussung endothelialer  $K_{Ca}$  durch spezifische pharmakologischen Modulatoren ein lohnendes und

sinnvolles antianginöses Therapieziel darstellen könnte, ist bislang unklar und bedarf einer weiteren Aufklärung der physiologischen und speziell pathophysiologischen Bedeutung dieser Kanäle. Dass diese Kanäle einen Einfluss auf retinale Angiogeneseprozesse im Sinne einer Zunahme von Gefäßverzweigungen haben, wurde in dieser Arbeit belegt. Der Verlust von  $K_{Ca3.1}$  und  $K_{Ca2.3}$  bzw. die Überexpression von  $K_{Ca2.3}$  führen jedoch zu keiner drastischen Auswirkung auf die Vaskularisierung oder die Funktion des Auges, somit bleibt der Schluss, dass die physiologische Gefäßentwicklung der murinen Retina nicht nachhaltig beeinträchtigt ist.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Angiogeneseprozesse spielen in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Neuere Forschungen legen nahe, dass auch endotheliale  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige  $\text{K}^+$ -Kanäle  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  und  $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$  wichtig für Angiogeneseprozesse sein könnten. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob ein Verlust oder eine Überstimulation oben genannter Kanäle – durch genetischen Knockout oder Induktion – einen Einfluss auf die morphologische und quantitative Vaskularisierung der Retina von juvenilen, 5- und 7-Tage alten, sowie von adulten, 30-Tage alten transgenen Tieren hat. Es wurden verschiedene bestehende Tiermodelle herangezogen, es waren der spezifische Knockout eines oder beider Kanäle, die Überexpression von  $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$  sowie eine Kombination von Knockout und Überexpression möglich. Es konnten bestehende und neue Methoden zur Retina-Präparation und Visualisierung der Netzhaut-Gefäße herangezogen und partiell entwickelt werden. Durch die Kombination eines ersten Typ IV Kollagen Antikörpers und eines zweiten, mit Alexa Fluor gekoppelten Antikörpers gegen den Ersten wurde eine sehr zuverlässige und homogene immunhistochemische Anfärbung der Gefäße erreicht. In einem weiteren Schritt wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop durch technisch-optische Hilfsmittel der Hauptgefäßplexus der Retina isoliert dargestellt und aus Einzelbildern ein digitales Bild der gesamten Retina erstellt. Auf dieses Abbild des Gefäßnetzes wurden verschiedene Arten der Auswertung angewandt, um die morphologischen Gefäßveränderungen quantitativ und qualitativ beurteilen zu können. Bei der Flächenanalyse wurde mittels einer Grauwert-Analyse ausgewertet, wie viel der Gesamtfläche eines Präparates mit Gefäßen bedeckt ist. Bei einer anderen Analyse wurden die Verzweigungen der Gefäße in definierten Arealen bestimmt um auf die Dichte des Kapillarnetzes Rückschlüsse zu ziehen. Als letztes wurden ebenfalls in definierten Arealen die Durchmesser sowohl kleiner als auch großer Gefäße bestimmt, um zu sehen, ob bei den verschiedenen Tiermodellen Unterschiede in der Größe der Gefäße bestehen.

Es konnte hier gezeigt werden, dass der Knockout des  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanals mit einer Zunahme der Anzahl der Gefäße in der Retina einhergeht, speziell die Anzahl der Verzweigungen der Gefäße sind signifikant höher. Auch der Knockout des  $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ -Kanals hat proangiotische Auswirkungen auf die Retina, was sich ebenfalls in einer Erhöhung der

Verzweigungen äußert. Ausgeprägter war diese Beobachtung bei einem Knockout beider Kanäle. Der Durchmesser der Arteriolen und Kapillaren ist in allen Gruppen unverändert. Bei sehr jungen, 5- und 7-Tage alten Tieren zeichnen sich in der Tendenz gleichgerichtete Veränderungen ab, wie sie in adulten Tieren beobachtet werden.

Die Eigenschaften der verwendeten Tiermodelle erlaubten Untersuchungen, in denen der  $K_{Ca2.3}$ -Kanal überexprimiert wird. Hier zeigte sich sowohl bei  $K_{Ca2.3}^{T/T}$  transgenen Tieren als auch bei  $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T}$  doppeltransgenen Tieren eine den Wildtypen vergleichbare Gefäßdichte bei Überexpression von  $K_{Ca2.3}$ .

In Bezug auf die Rolle der Kanäle  $K_{Ca3.1}$  und  $K_{Ca2.3}$  wurde in der vorliegenden Arbeit die These der Einflussnahme auf Angiogeneseprozesse beider Kanäle dargelegt. Es ist denkbar, dass sich diese Kanäle in Zukunft als ein lohnendes Ziel für pharmakologische Beeinflussung von Gefäßwachstum und Neoangiogenese herausstellen.

## SUMMARY

Angiogenesis plays an important role in many physiological and pathological processes. It is well known that the stimulation for vessel growth is controlled by ion channels in the endothelial cell membrane. Recent results suggest that the two calcium dependant potassium channels  $K_{Ca3.1}$  and  $K_{Ca2.3}$  are also important for angiogenesis.

In this dissertation I investigated whether a change of expression in terms of knockout or upregulation affect the morphological and quantitative vascularisation of the retina. Analysis took place in young, 5- and 7-days old mice and in adult, 30-days old mice in different types of transgenic animals.

It was possible to either specifically knockout one of the two channels, overexpress  $K_{Ca2.3}$  or to combine knockout and overexpression. For the evaluation it was necessary to use and refine existing and to develop new methods for the preparation and visualisation of the retinal vessels. A very reliable and homogeneous immunohistochemical staining of the vessels was reached by combining two antibodies. The first one was a type IV Kollagen antibody and the second one, coupled with alexa fluor, was specific to the first one. The preparation was then used to produce a graph of the main retinal vessel plexus of the retina and to obtain a picture of the complete retina via technical-optical methods. The so obtained picture was analysed using different methods to qualitatively and quantitatively determine the morphological changes of the

vessels. A grey scale analysis was used to determine which percentage of the total area was covered with vessels. Additionally, the branching of the vessels in certain areas was evaluated to obtain the density of the capillary plexus. Finally, the diameter of both small as well as large vessels was measured to examine whether there are differences between the animal models.

It was possible to show that the knockout of the  $K_{Ca3.1}$  channel coincides with a increase of vessels in the retina, and specifically with a significant increase of the vascular branching. Similarly, the knockout of the  $K_{Ca2.3}$  channel effects proangiogenic changes in the retina, also causing an increase in the branching. Furthermore, the knockout of both channels increases the vascular branching as compared to the knockout of only one channel. However, the diameter of the capillars is not changed in any group of animal models. For the very young, five and seven day old, animals the results are less obvious and there are no clear differences between the different animal models, even though tendencies similar to the adult mice are discernible.

Additionally, the used animal models allowed for investigation of the effects of overexpression of the  $K_{Ca2.3}$  channel on the vascularisation of the retina.  $K_{Ca2.3}^{T/T}$  transgenic animals and double transgenic animals  $K_{Ca3.1}^{-/-} K_{Ca2.3}^{T/T}$  with an overexpression of  $K_{Ca2.3}$  showed a vessel density compared to the Wildtypes.

The dependence of the  $K_{Ca3.1}$  and  $K_{Ca2.3}$  channels for angiogenic effects have been shown in this dissertation. It is possible that these channels could be a useful target for pharmacological manipulation of neovascularisation and vessel growth.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Benzaquen, L., Brugnara, C., Byers, H. R., Gatton-Celli, S. und Halperin, J. A.,** "Clotrimazole inhibits cell proliferation in vitro and in vivo," *Nat Med*, 1995, 534-40.
2. **Berridge, M. J.,** "Calcium signalling and cell proliferation," *Bioessays*, 1995, 491-500.
3. **Berridge, M. J., Lipp, P. und Bootman, M. D.,** "The versatility and universality of calcium signalling," *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000, 11-21.
4. **Bond, C. T., Sprengel, R., Bissonnette, J. M. et al.,** "Respiration and parturition affected by conditional overexpression of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel subunit, SK3," *Science*, 2000, 1942-6.
5. **Brahler, S., Kaistha, A., Schmidt, V. J. et al.,** "Genetic deficit of SK3 and IK1 channels disrupts the endothelium-derived hyperpolarizing factor vasodilator pathway and causes hypertension," *Circulation*, 2009, 2323-32.
6. **Cardno, A. G., Bowen, T., Guy, C. A. et al.,** "CAG repeat length in the hKCa3 gene and symptom dimensions in schizophrenia," *Biol Psychiatry*, 1999, 1592-6.
7. **Carmeliet, P.,** "Manipulating angiogenesis in medicine," *J Intern Med*, 2004, 538-61.
8. **Carmeliet, P.,** "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis," *Nat Med*, 2000, 389-95.
9. **Chandy, K. G., Fantino, E., Wittekindt, O. et al.,** "Isolation of a novel potassium channel gene hSKCa3 containing a polymorphic CAG repeat: a candidate for schizophrenia and bipolar disorder?" *Mol Psychiatry*, 1998, 32-7.

10. **Dirix, L. Y., Vermeulen, P. B., Hubens, G. et al.**, "Serum basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor and tumour growth kinetics in advanced colorectal cancer," *Ann Oncol*, 1996, 843-8.
11. **Drenckhahn, D., Asan, E. und Benninghoff, A.**, "Herz-Kreislauf-System, lymphatisches System, endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut," 2004, XII, 876.
12. **Fanger, C. M., Ghanshani, S., Logsdon, N. J. et al.**, "Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1," *J Biol Chem*, 1999, 5746-54.
13. **Figueroa, K. P., Chan, P., Schols, L. et al.**, "Association of moderate polyglutamine tract expansions in the slow calcium-activated potassium channel type 3 with ataxia," *Arch Neurol*, 2001, 1649-53.
14. **Fruttiger, M.**, "Development of the mouse retinal vasculature: angiogenesis versus vasculogenesis," *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 522-7.
15. **Fruttiger, M.**, "Development of the retinal vasculature," *Angiogenesis*, 2007, 77-88.
16. **Gardos, G.**, "The permeability of human erythrocytes to potassium," *Acta Physiol Hung*, 1956, 185-9.
17. **Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M. et al.**, "VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia," *J Cell Biol*, 2003, 1163-77.
18. **Ghanshani, S., Wulff, H., Miller, M. J. et al.**, "Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences," *J Biol Chem*, 2000, 37137-49.



19. Grgic, I., Wulff, H., Eichler, I. et al., "Blockade of T-lymphocyte KCa3.1 and Kv1.3 channels as novel immunosuppression strategy to prevent kidney allograft rejection," *Transplant Proc*, 2009, 2601-6.
20. Grgic, I., Eichler, I., Heinau, P. et al., "Selective blockade of the intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel suppresses proliferation of microvascular and macrovascular endothelial cells and angiogenesis in vivo," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 704-9.
21. Grgic, I., Kaistha, B. P., Hoyer, J. und Kohler, R., "Endothelial Ca<sup>++</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in normal and impaired EDHF-dilator responses--relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery," *Br J Pharmacol*, 2009, 509-26.
22. Grgic, I., Kaistha, B. P., Paschen, S. et al., " Disruption of the Gardos channel (KCa3.1) in mice causes subtle erythrocyte macrocytosis and progressive splenomegaly," *Pflugers Arch*, 2009, 291-302.
23. Grgic, I., Kiss, E., Kaistha, B. P. et al., "Renal fibrosis is attenuated by targeted disruption of KCa3.1 potassium channels," *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 14518-23.
24. Gutman, G. A., Chandy, K. George, A., John P. et al., "International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels," *Pharmacol Rev*, 2003, 583-6.
25. Haburcak, M., Wei, L., Viana, F. et al., "Calcium-activated potassium channels in cultured human endothelial cells are not directly modulated by nitric oxide," *Cell Calcium*, 1997, 291-300.
26. Hellstrom, M., Phng, L. K., Hofmann, J. et al., "Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis," *Nature*, 2007, 776-80.

27. Hoyer, J., Distler, A., Haase, W. und Gogelein, H., "Ca<sup>2+</sup> influx through stretch-activated cation channels activates maxi K<sup>+</sup> channels in porcine endocardial endothelium," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 2367-71.
28. Hughes, S., Yang, H. und Chan-Ling, T., "Vascularization of the human fetal retina: roles of vasculogenesis and angiogenesis," *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 1217-28.
29. Ishii, T. M., Silvia, C., Hirschberg, B. et al., "A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 11651-6.
30. Jensen, B. S., Odum, N., Jorgensen, N. K., Christophersen, P. und Olesen, S. P., "Inhibition of T cell proliferation by selective block of Ca(2+)-activated K(+) channels," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 10917-21.
31. Kalka, C., Asahara, T., Krone, W. und Isner, J. M., "Angiogenese und Vaskulogenese. Therapeutische Strategien zur Stimulation der postnatalen Neovaskularisation," *Herz*, 2000, 611-22.
32. Kanski, J. J., Burk, A. und Burk, R., *Klinische Ophthalmologie: Lehrbuch und Atlas*, München [u.a.]: Elsevier, Urban Fischer, 2008.
33. Kasai, A., Shintani, N., Kato, H. et al., "Retardation of retinal vascular development in apelin-deficient mice," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 1717-22.
34. Kassmeyer, S., Plendl, J., Custodis, P. und Bahrami, M., "New insights in vascular development: vasculogenesis and endothelial progenitor cells," *Anat Histol Embryol*, 2009, 1-11.
35. Kohler, M., Hirschberg, B., Bond, C. T. et al., "Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain," *Science*, 1996, 1709-14.

36. Kohler, R., Degenhardt, C., Kuhn, M. et al., "Expression and function of endothelial  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels in human mesenteric artery: A single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction and electrophysiological study in situ," *Circ Res*, 2000, 496-503.
37. Kohler, R., Wulff, H., Eichler, I. et al., "Blockade of the intermediate-conductance calcium-activated potassium channel as a new therapeutic strategy for restenosis," *Circulation*, 2003, 1119-25.
38. Kohn, E. C., Alessandro, R., Spoonster, J., Wersto, R. P. und Liotta, L. A., "Angiogenesis: role of calcium-mediated signal transduction," *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 1307-11.
39. Koronyo-Hamaoui, M., Danziger, Y., Frisch, A. et al., "Association between anorexia nervosa and the  $\text{hSKCa3}$  gene: a family-based and case control study," *Mol Psychiatry*, 2002, 82-5.
40. Kragh, M., Hjarnaa, P. J. V., Bramm, E. et al., "In vivo chamber angiogenesis assay: an optimized Matrigel plug assay for fast assessment of anti-angiogenic activity," *Int J Oncol*, 2003, 305-11.
41. Ledoux, J., Werner, M. E., Brayden, J. E. und Nelson, M. T., "Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone," *Physiology (Bethesda)*, 2006, 69-78.
42. Ling, B. N. und O'Neill, W. C., " $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable ion channels in aortic endothelial cells," *Am J Physiol*, 1992, H1827-38.
43. Logsdon, N. J., Kang, J., Togo, J. A., Christian, E. P. und Aiyar, J., "A novel gene,  $\text{hKCa4}$ , encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes," *J Biol Chem*, 1997, 32723-6.

44. Nikol, S., Pelisek, J., Engelmann, M. G. et al., "Vascular endothelial growth factor (VEGF165) and its influence on angiogenesis versus arteriogenesis in different vascular beds," *J Endovasc Ther*, 2002, 842-54.
45. Nilius, B., Viana, F. und Droogmans, G., "Ion channels in vascular endothelium," *Annu Rev Physiol*, 1997, 145-70.
46. Preston, G. A., Barrett, J. C., Biermann, J. A. und Murphy, E., "Effects of alterations in calcium homeostasis on apoptosis during neoplastic progression," *Cancer Res*, 1997, 537-42.
47. Rehak, M., Hollborn, M., Iandiev, I. et al., "Retinal gene expression and Muller cell responses after branch retinal vein occlusion in the rat," *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 2359-67.
48. Risau, W. und Flamme, I., "Vasculogenesis," *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995, 73-91.
49. Risau, W., "Mechanisms of angiogenesis," *Nature*, 1997, 671-4.
50. Rusko, J., Tanzi, F., van Breemen, C. und Adams, D. J., "Calcium-activated potassium channels in native endothelial cells from rabbit aorta: conductance,  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity and block," *J Physiol*, 1992, 601-21.
51. Schaper, W. und Buschmann, I., "Arteriogenesis, the good and bad of it," *Cardiovasc Res*, 1999, 835-7.
52. Schaper, W. und Scholz, D., "Factors regulating arteriogenesis," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 1143-51.
53. Scholz, D., Cai, W. J. und Schaper, W., "Arteriogenesis, a new concept of

- vascular adaptation in occlusive disease," *Angiogenesis*, 2001, 247-57.
- 54. Semenza, G. L.,** "Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling," *J Cell Biochem*, 2007, 840-7.
- 55. Si, H., Heyken, W. T., Wolffe, S. E. et al.,** "Impaired endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated dilations and increased blood pressure in mice deficient of the intermediate-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel," *Circ Res*, 2006, 537-44.
- 56. Stocker, M.,** " $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels: molecular determinants and function of the SK family," *Nat Rev Neurosci*, 2004, 758-70.
- 57. Stone, J. und Dreher, Z.,** "Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina," *J Comp Neurol*, 1987, 35-49.
- 58. Suh, S. H., Vennekens, R., Manolopoulos, V. G. et al.,** "Characterisation of explanted endothelial cells from mouse aorta: electrophysiology and  $\text{Ca}^{2+}$  signalling," *Pflugers Arch*, 1999, 612-20.
- 59. Taylor, M. S., Bonev, A. D., Gross, T. P. et al.,** "Altered expression of small-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  (SK3) channels modulates arterial tone and blood pressure," *Circ Res*, 2003, 124-31.
- 60. Uemura, A., Kusuvara, S., Katsuta, H. und Nishikawa, S. I.,** "Angiogenesis in the mouse retina: a model system for experimental manipulation," *Exp Cell Res*, 2006, 676-83.
- 61. Ulmasov, B., Bruno, J., Gordon, N., Hartnett, M. E. und Edwards, J. C.,** "Chloride intracellular channel protein-4 functions in angiogenesis by supporting acidification of vacuoles along the intracellular tubulogenic pathway," *Am J Pathol*, 2009, 1084-96.

62. Vazquez, E., Nobles, M. und Valverde, M. A., "Defective regulatory volume decrease in human cystic fibrosis tracheal cells because of altered regulation of intermediate conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent potassium channels," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 5329-34.
63. Wang, S., Wu, Z., Sorenson, C. M., Lawler, J. und Sheibani, N., "Thrombospondin-1-deficient mice exhibit increased vascular density during retinal vascular development and are less sensitive to hyperoxia-mediated vessel obliteration," *Dev Dyn*, 2003, 630-42.
64. Watanabe, T. und Raff, M. C., "Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve," *Nature*, 1988, 834-7.
65. Wei, A. D., Gutman, G. A., Aldrich, R. et al., "International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels," *Pharmacol Rev*, 2005, 463-72.
66. West, H., Richardson, W. D. und Fruttiger, M., *Stabilization of the retinal vascular network by reciprocal feedback between blood vessels and astrocytes* 2005.
67. Wulff, H., Miller, M. J., Hansel, W. et al., "Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel,  $\text{IKCa1}$ : a potential immunosuppressant," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 8151-6.

## 7 VERZEICHNIS AKADEMISCHER LEHRER

**Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:**

Adamkiewicz	Gress	Löffler
Aumüller	Grimm	Lohoff
Barth	Grundmann	Maier
Bartsch	Grzeschik	Maisch
Basler	Hasilik	Mandrek
Bauer	Hegele	Martin
Baum	Hertl	Meyer
Bauman	Höffken	Mittag
Baumann	Hofmann	Moll
Becker	Höglinger	Moosdorf
Berger	Horn	Mueller
Bette	Hoyer	Müller
Bien	Kalinowski	Mutters
Brehm	Kann	Neubauer
Cetin	Kaufmann	Neumüller
Czubayko	Kerzel	Nimphius
Daut	Kill	Oertel
Del Rey	Klenk	Olbert
Dietrich	Klose	Opitz
Donner-Banzhoff	Köhler	Pagenstecher
Eberhart	Koolman	Plant
Eilers	Krebber	Ramaswamy
Fendrich	Kroll	Rausch
Feuser	Krones	Renz
Geks	Kuhlmann	Richter
Gemsa	Langer	Risse
Gerdes	Lehr	Röhm
Glorius	Lill	Rölke
Görg	Liss	Röper

---

Rosenow	Sesterhenn	Wennemuth
Rothmund	Sommer	Werner
Ruchholtz	Sönnichsen	Westermann
Schade	Steiniger	Wiegand
Schäfer	Tackenberg	Wilhelm
Schmidt	Vogelmeyer	Wulff
Schofer	Voigt	Yu
Schrader	Wagner	Zemlin
Schultze	Waldegger	
Seitz	Weihe	



## 8 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all denen Danken, ohne die eine Vollendung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Besonderen Dank möchte ich meinem Betreuer Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Ralf Köhler für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas sowie die fortwährende Unterstützung und Betreuung der Arbeit aussprechen. Der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Nephrologie unter Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Hoyer danke ich für die großzügige Bereitstellung von Labor und neuesten Forschungsmaterialien.

Meinem Kollegen Herrn Brajesh Pratap Kaistha gilt großer Dank für sehr hilfreiche Tipps sowie der geduldigen Hilfe bei neuen Techniken.

Den anderen Kollegen unserer Arbeitsgruppe danke ich für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit und die ermutigenden Worte bei kleinen und größeren Problemen. Zuletzt möchte ich noch in besonderem Maße meiner Familie für die ständige moralische und finanzielle Unterstützung während meiner schulischen und universitären Ausbildung danken. Ohne sie wären dieses Studium und das Anfertigen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.